

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Direktor: Prof. Dr. med. J.-C. Tonn

**Interaktionsmuster von Gliomzellen, Gliomendothelzellen
und humanen mesenchymalen Stammzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Benjamin Korte

aus
Mönchengladbach

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

Mitberichterstatter:
Priv. Doz. Dr. med. Ulrich Schüller
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christian Schichor

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2012

1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
2	ABKÜRZUNGEN	7
3	EINLEITUNG	9
3.1	KLASSIFIKATION VON HIRNTUMOREN.....	9
3.2	GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	9
3.2.1	<i>Epidemiologie</i>	9
3.2.2	<i>Pathogenese und Histologie.....</i>	10
3.2.3	<i>Klinik</i>	11
3.2.4	<i>Diagnostik.....</i>	11
3.2.5	<i>Therapie.....</i>	12
3.3	HUMANE MESENCHYMALLE STAMMZELLEN	13
3.4	EXPERIMENTELLE THERAPIEOPTIONEN.....	14
3.5	GRUNDLEGENDE ZELLPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN	15
3.5.1	<i>Gap junctions</i>	16
3.5.2	<i>Zellfusion.....</i>	17
4	FRAGESTELLUNG	18
5	MATERIAL	19
5.1	ZELLVERSUCHE	19
5.1.1	<i>Geräte und Laborhilfen.....</i>	19
5.1.2	<i>Verbrauchmaterialien</i>	21
5.1.3	<i>Reagenzien.....</i>	22
5.1.4	<i>Zellkultur Medien und Zusätze</i>	24
5.1.5	<i>Antikörper.....</i>	25
5.1.6	<i>Zelllinien.....</i>	25
5.2	TIEREXPERIMENTE.....	27
5.2.1	<i>Geräte</i>	27
5.2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	27
5.2.3	<i>Medikamente.....</i>	28
5.2.4	<i>Versuchstiere</i>	28
6	METHODEN	29
6.1	ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	29
6.1.1	<i>Mediumwahl.....</i>	29
6.1.2	<i>Kultivieren von Zellen</i>	31
6.1.3	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	31
6.1.4	<i>Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen</i>	32
6.1.5	<i>Gelatinebeschichtung von Zellkulturflaschen.....</i>	33
6.1.6	<i>Herstellung von stammzellkonditioniertem Medium.....</i>	33
6.1.7	<i>Isolation von GB-ECs, bmMSCs und gbMSCs.....</i>	33
6.1.7.1	<i>Isolation von GB-ECs</i>	33
6.1.7.2	<i>Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen</i>	35
6.1.7.2.1	<i>Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark.....</i>	35
6.1.7.2.2	<i>Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Tumorresektaten</i>	37
6.1.8	<i>In vitro Färbemethoden</i>	38
6.1.8.1	<i>Calcein AM Zytoplasmafärbung</i>	38
6.1.8.2	<i>Lipophilic Tracer Membranfärbung</i>	39
6.1.8.3	<i>Dextran-Tetramethylrhodamine Zytoplasmafärbung</i>	39
6.1.8.4	<i>Quantum Dots Zytoplasmafärbung</i>	40
6.1.8.5	<i>Organelle Lights Transfizierung</i>	41
6.1.8.6	<i>Fixierung und DAPI Kernfärbung</i>	42
6.1.9	<i>Mikroskopie</i>	42
6.1.9.1	<i>Durchlichtmikroskopie</i>	43
6.1.9.2	<i>Phasenkontrastmikroskopie</i>	43
6.1.9.3	<i>DIC-Mikroskopie</i>	43

6.1.9.4	Fluoreszenzmikroskopie	43
6.1.9.5	Kombinationsmöglichkeiten.....	44
6.1.10	Tube Formation Assay	44
6.1.10.1	Durchführung	44
6.1.10.2	Quantifizierung	45
6.1.11	Ko-Kultur	45
6.1.11.1	Durchführung mit verschiedenen Färbetechniken	45
6.1.11.2	Quantifizierung	46
6.1.12	Sphäroidkultur	46
6.1.12.1	Anlegen von Sphäroiden	47
6.1.12.1.1	Sphäroide auf Agar-beschichteten Böden	47
6.1.12.1.2	Sphäroide im hängenden Tropfen	47
6.1.12.2	Calcein-Stammzellosphäroid auf Tumorzellrasen.....	48
6.1.12.3	Migrationsassay mit Sphäroiden.....	48
6.1.12.3.1	Durchführung	48
6.1.12.3.2	Quantifizierung	49
6.1.13	Blockierung der gap junction Kommunikation durch Glycyrhettininsäure (AGA)	49
6.1.14	Immunzytochemie	50
6.1.15	Western Blot	51
6.1.15.1	Verwendete Lösungen	51
6.1.15.2	Proteinisolation	52
6.1.15.3	Proteinbestimmung nach Bradford	52
6.1.15.4	Chemilumineszenz	53
6.1.16	Immunzytochemie einer Co-Kultur	54
6.2	TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.....	54
6.2.1	<i>Orthotope Tumorimplantation intrakraniell</i>	56
6.2.2	<i>MRT-Kontrolle.....</i>	57
6.2.3	<i>i.v.-Gabe von hMSC</i>	57
6.2.4	<i>i.p.-Gabe von Ganciclovir</i>	58
6.2.5	<i>Präparation der Hirnresektate</i>	58
6.2.6	<i>Aufarbeitung der Hirnresektate</i>	58
6.2.7	<i>HE-Färbung der Hirnpräparate</i>	59
6.2.8	<i>Immunhistochemie der Hirnpräparate</i>	59
7	ERGEBNISSE	61
7.1	MODIFIZIERTE, NEUARTIGE METHODEN	61
7.1.1	<i>Tube Formation Assay mit Endothelzellen und hMSCs</i>	61
7.1.2	<i>Sphäroide aus Tumorzellen und hMSCs</i>	65
7.2	INTERAKTION VON GLIOMZELLEN UND HMSCS ALS FUNKTIONELLES SYNZYTIUM.....	68
7.2.1	<i>Gap junction vermittelter Austausch von Calcein in Co-Kulturen von Gliom- und Stammzellen</i>	68
7.2.2	<i>Gap junction Inhibition mittels Glycyrhettininsäure (AGA)</i>	71
7.2.3	<i>Connexin-Nachweis mittels Immunzytochemie</i>	73
7.2.4	<i>Connexin-Nachweis mittels Western Blot</i>	74
7.3	INTERAKTION VON GLIOMZELLEN UND HMSCS ALS STRUKTURELLES SYNZYTIUM.....	76
7.3.1	<i>Fusions-Nachweis mittels Lipophilic Tracers</i>	76
7.3.2	<i>Fusions-Nachweis mittels Dextran-Rhodamine</i>	79
7.3.3	<i>Fusions-Nachweis mittels Quantum Dots</i>	80
7.3.4	<i>Fusions-Nachweis mittels Organelle Lights</i>	82
7.3.5	<i>Fusions-Nachweis mittels Immunzytochemie SV40</i>	82
7.4	TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.....	84
7.4.1	<i>Verlauf</i>	84
7.4.2	<i>Verlaufskontrolle mittels MRT-Scan</i>	84
7.4.3	<i>Immunhistochemie der Hirnpräparate</i>	86
8	DISKUSSION	87
8.1	HMSCS TRAGEN ZUR NEOANGIOGENESE EINES GLIOMS BEI.....	87
8.2	FUNKTIONELLES SYNZYTIUM AUS GLIOM- UND STAMMZELLEN.....	88
8.3	STRUKTURELLES SYNZYTIUM AUS GLIOM- UND STAMMZELLEN.....	91
8.4	HMSCS TRAGEN ZUR TUMORIGENITÄT BEI.....	92

8.5	EINSATZ VON GENETISCH MODIFIZIERTEN HMSCS SINNVOLL.....	94
8.6	DER SCHRITT VON IN VITRO ZU IN VIVO.....	95
9	ZUSAMMENFASSUNG	96
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
11	DANKSAGUNG	114

1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GAP JUNCTION: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME UND TOPOLOGISCHES MODELL.....	16
ABBILDUNG 2: ISOLATION VON HMSC AUS KNOCHENMARKSPENDE	37
ABBILDUNG 3: ISOLATION VON HMSC AUS TUMORRESEKTAT	38
ABBILDUNG 4: STRUKTUR EINES NANOKRISTALLS	40
ABBILDUNG 5: ORGANELLE LIGHTS TRANSFEKTION.....	41
ABBILDUNG 6: SPHÄROIDMIGRATIONSFÄLCE	49
ABBILDUNG 7: ANATOMISCHE SKIZZE EINES RATTENSCHÄDEL	56
ABBILDUNG 8: INTRAOPERATIVES BILD, TUMORINJEKTION	56
ABBILDUNG 9: VERSUCHSTIER IM MRT.....	57
ABBILDUNG 10: ZEITLICHES ZUSTANDEKOMMEN DER TUBE FORMATION	62
ABBILDUNG 11: TUBE FORMATION AUS GB-ECs	63
ABBILDUNG 12: TUBE FORMATION VON GB-ECs MIT HMSCs	64
ABBILDUNG 13: TUBE FORMATION VON GB-ECs IN KOND. MEDIUM SOWIE HMSCs	64
ABBILDUNG 14: SPHÄROIDMIGRATION I.....	66
ABBILDUNG 15: SPHÄROIDMIGRATION II.....	66
ABBILDUNG 16: SPHÄROIDMIGRATION: UNTERSCHIEDLICHE ZELLTYPEN.....	67
ABBILDUNG 17: SPHÄROIDMIGRATION AUS U373GFP UND HMSCs.....	67
ABBILDUNG 18: SPHÄROIDMIGRATION: DREI ZELLTYPEN VORHANDEN.....	67
ABBILDUNG 19: CALCEIN-TRANSFER BEI VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN	69
ABBILDUNG 20: CALCEIN-TRANSFER AUS HMSC ZU U87-GLIOMZELLEN	70
ABBILDUNG 21: SCHNEEBALL-EFFEKT DES CALCEIN-TRANSFERS ÜBER GAP JUNCTIONS.....	70
ABBILDUNG 22: KONZENTRATIONSABHÄNGIGE INHIBITION DES CALCEIN-TRANSFERS	72
ABBILDUNG 23: REVERSIBILITÄT DER GAP JUNCTION INHIBITION.....	72
ABBILDUNG 24: IMMUNZYTOKHEMIE Cx43 TEIL1.....	73
ABBILDUNG 25: IMMUNZYTOKHEMIE Cx43 TEIL2.....	74
ABBILDUNG 26: WESTERN BLOT ANALYSE AUF CONNEXINE	75
ABBILDUNG 27: ANZAHL FUSIONERTER ZELLEN BEI LIPOPHILIC TRACER-FÄRBUNG	77
ABBILDUNG 28: LIPOPHILIC TRACER: FUSION U373 UND HMSC	77
ABBILDUNG 29: LIPOPHILIC TRACER: FUSION GB-EC UND HMSC	78
ABBILDUNG 30: LIPOPHILIC TRACER: FUSION HMSC MIT VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN.....	78
ABBILDUNG 31: DEXTRAN-RHODAMINE: FUSION AUS U87 UND HMSC.....	79
ABBILDUNG 32: ANZAHL FUSIONERTER ZELLEN BEI QUANTUM DOT VERSUCHEN.....	80
ABBILDUNG 33: QUANTUM DOT: FUSION HMSC UND GLIOMZELLE I	81
ABBILDUNG 34: QUANTUM DOT: FUSION HMSC UND GLIOMZELLE II	81
ABBILDUNG 35: QUANTUM DOT: FUSION HMSC UND GLIOMZELLE / ASTROZYTEN.....	81
ABBILDUNG 36: TRANSFEKTION MITTELS ORGANELLE LIGHTS	82
ABBILDUNG 37: SV40-IMMUNZYTOKHEMIE EINER Co-KULTUR AUS U373GFP UND L87	83
ABBILDUNG 38: MRT-BILD EINES RATTENHIRNS MIT IMPLANTIERTEN TUMOR.....	85
ABBILDUNG 39: MRT-BILD EINES RATTENHIRNS MIT SUBSTANZDEFEKT ALS FOLGE DER IMPLANTATION	85

2 Abkürzungen

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
AGA	18 α -Glycyrrhetic acid
AM	bis-Acetoxymethylester
bmMSC	aus Knochenmarkgewebe gewonnene mesenchymale Stammzellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CT	Computertomographie
Cx	Connexin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's PBS
ES	Embryonale Stammzelle
FET-PET	O-(2-[18F]Fluorethyl)-L-Tyrosin/Positronen-Emissions-Tomographie
Flt-1	VEGF-Rezeptor
GB-EC	Glioblastom-Endothelzellen
GBM	Glioblastoma multiforme
gbMSC	aus Glioblastomgewebe gewonnene mesenchymale Stammzellen
GC-GBM	Großzelliges Glioblastom
GFP	Green fluorescence protein
GS	Gliosarkom
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HSV-tk	Herpes simplex Virus Thymidinkinase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

KDR	VEGF Rezeptor-2 Gen
MGMT	O-6-Methyl-Guanin-DNA-Methyl-Transferase
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natriumchlorid
NSC	Neuronale Stammzelle
PBS	phosphate buffered saline
RFP	Red fluorescent protein
SDF-1	stromal derived factor 1
siRNA	short interfering RNA
Tk	Thymidinkinase
TMZ	Temozolomid
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	Von Willebrand Faktor
WHO	World health organisation

3 Einleitung

3.1 Klassifikation von Hirntumoren

Gliome sind Neoplasien des zentralen Nervensystems. Sie gehen von den Zellen des Hirnparenchyms aus und zeichnen sich durch astrozytäre, oligodendrogliale oder ependymale Differenzierung aus. Sie werden, wie andere Tumorentitäten auch, unter Annahme einer Entdifferenzierungsreihe klassifiziert. Der hier zu Grunde liegenden WHO-Klassifikation dienen histologische Charakteristika wie Kernatypien, Mitosen, vaskuläre Proliferation und Nekrosen zur Gradierung. Demnach werden Tumore in die WHO-Grade I – IV unterschieden, die auch eine Aussage über klinischen Verlauf und Prognose erlauben. Die Mehrzahl wird als maligne eingestuft (WHO Grad II – IV). Das im Folgenden behandelte Glioblastoma multiforme (GBM) wird als Grad IV klassifiziert.^{77;78;122}

3.2 Glioblastoma multiforme

Der zelluläre Ursprung astrozytärer Tumore wie des Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) ist noch nicht vollständig geklärt. Neueste wissenschaftliche Untersuchungen legen nahe, dass sich sogenannte neuronale Stamm- oder Vorläuferzellen durch Genmutation zu astrozytären Tumoren entwickeln können³. Das Glioblastoma multiforme ist mit 50 – 60% der Fälle der häufigste astrozytäre Tumor. Die häufigste Lokalisation sind die Großhirnhemisphären, hier ist eine fronto-temporale Position am wahrscheinlichsten, gefolgt von der Balkenregion, dem Zwischenhirn und dem Hirnstamm.¹³

3.2.1 Epidemiologie

Mit 15-20% ist das Glioblastoma multiforme auch der häufigste intrakranielle Tumor. Die Inzidenz liegt bei 2–3 : 100 000 pro Jahr. Der Tumor tritt vermehrt bei älteren Menschen auf, der Altersgipfel liegt bei durchschnittlich 62 Jahren. Männer sind häufiger betroffen als Frau-

en: 1,6 : 1. Das Glioblastom tritt aber auch bei Kindern auf. Im Altersbereich unter 2 Jahren ist es der dritthäufigste Tumor überhaupt.^{13;77;132}

3.2.2 Pathogenese und Histologie

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie ein GBM entstehen kann: das primäre Glioblastom entsteht *de novo*, ohne einen Hinweis auf eine niedrig gradigere Vorstufe. Diese Variante hat einen raschen klinischen Verlauf und kommt hauptsächlich bei älteren Patienten (6.-7. Lebensdekade) vor. Das sekundäre Glioblastom entwickelt sich durch Progression aus einem niedrig gradigeren Tumor (WHO-Grad II oder III) und kommt häufiger bei im Vergleich jüngeren Patienten vor (5.-6. Dekade). Diese Malignisierung verläuft in längeren Zeiträumen (Monate bis Jahre) oder entsteht im Zuge eines Rezidivs nach operativer Behandlung.

Morphologisch wird das Glioblastom nach aktueller WHO-Klassifikation hauptsächlich in drei Varianten unterschieden: Das konventionelle, auch kleinzellige GBM, das großzellige GBM (GC-GBM) und das Gliosarkom (GS). Diese Differenzierung dient der Therapie und der Prognose.⁸⁴

Die bereits beschriebene, auf der Histologie basierende WHO-Klassifikation kommt hier zum Tragen: Die histologischen Charakteristika Kernatypien, Mitosen, vaskuläre Proliferation und Nekrosen sind Kennzeichen eines Glioblastoms. Eine weitere Eigenschaft des GBMs ist die Tatsache, dass es, wie andere primäre Hirntumore auch, sehr selten Metastasen bildet.

Sowohl die hohe Malignität und Rezidivrate als auch die Schwierigkeiten bei lokalen Therapiemaßnahmen finden unter Anderem in folgenden Eigenschaften ihre Erklärung: Die Zellen eines Glioblastoms zeichnen hohe Migrationseigenschaften, d.h. die Fähigkeit einzelner Zellen innerhalb eines Gewebes zu wandern und das Glioblastom selbst gute Invasionscharakteristika, d.h. das Vermögen in umliegendes Gewebe einzuwachsen, aus. Dies führt zu einer raschen Ausbreitung des GBMs, was zu einer diffusen Infiltration des umliegenden, gesunden Hirngewebes führt. Dies erklärt die hohe Rezidivrate, da auch nach einer bildmorphologisch kompletten Exstirpation des Tumors op-mikroskopisch nicht sichtbare Zellen im gesunden Parenchym verbleiben, von wo aus das Rezidivwachstum ausgeht.

Ein weiterer Aspekt der hohen Malignität ist die Neoangiogenese⁶⁷: Tumorzellen infiltrieren das Gehirn entlang von Bahnen der weißen Substanz oder entlang von Blutgefäßen. Die

rasch proliferierende Zellmasse unterliegt einem stetig wachsenden Mangel an Sauerstoff und Substratzufuhr, weshalb der Tumor ab einer gewissen Größe über Diffusion nicht mehr ausreichend versorgt wird. Hier setzen Vorgänge der Angiogenese ein: Hypoxie und von den Tumorzellen sezernierte Botenstoffe wie VEGF (vascular endothelial growth factor), Angiopoetin 1 und 2 sowie SDF1 (stromal derived factor 1) bewirken eine Angiogenese aus vorhandenen Gefäßen zu dem Tumorgebiet hin oder, durch SDF1 moderiert, eine Vaskulogenese, also eine Gefäßneubildung im Tumor selbst^{2;63;112}. Diese neu entstandenen Gefäße sind unorganisiert, größer im Durchmesser und höchst permeabel, was zu einer Ödembildung und demzufolge zu gesteigertem Druck, Unterversorgung und Nekrose führt, was wiederum eine erneute Neoangiogenese sowie aber andererseits auch Einblutungen in den Tumor mit sich zieht⁹⁶.

3.2.3 Klinik

Das Tumorwachstum und die Ödembildung führen zwangsläufig zu einem erhöhten intrakraniellen Druck, der sich klinisch wie folgt äußern kann: Als häufigstes initiales Symptom wird von Patienten Kopfschmerz angegeben, gefolgt von Übelkeit, Erbrechen und kognitiven Beeinträchtigungen. Bei Progredienz können neurologische Ausfallscheinungen wie Paresen, Aphasien oder Krampfanfälle auftreten, wobei es möglich ist, aus fokalen Symptomen auf die intrakranielle Lokalisation des Glioblastoms rückzuschließen. In späterem Stadium kann es zu Somnolenz oder Koma führen. Die Diagnose wird jedoch nicht nur klinisch, sondern anhand der Bildgebung und des histologischen Befunds gestellt.⁵⁶

3.2.4 Diagnostik

Die Diagnostik eines Glioblastoms wird zunächst auf ein CT (Computertomographie) oder ein MRT (Magnetresonanztomographie) als bildgebende Verfahren gestützt. Mit Hilfe von Kontrastmitteln wie Gadolinium³⁷ lässt sich im MRT ein charakteristisch girlandenförmiges Enhancement darstellen, das die soliden Tumoranteile wiedergibt. Dunkle Aussparungen geben Einblutungen, Ödeme oder Nekrosen wieder. Weitere Verfahren wie FET-PET ($O\text{-}(2-$

[¹⁸F]Fluoreethyl)-L-Tyrosin/Positronen-Emissions-Tomographie) oder diffusionsgewichtetes MRT können zusätzliche Informationen zur Operationsplanung liefern. Die endgültige Diagnose wird neuropathologisch an einem Resektat aus stereotaktischer Biopsie oder Operation gewonnen. Als Differentialdiagnosen kommen andere Hirntumore, Metastasen nicht hirnreiner Tumore oder Abszesse in Betracht.⁵⁶

3.2.5 Therapie

Initial besteht die Therapie eines Glioblastoma multiforme, nach Prüfung der Operabilität des Patienten, aus der Resektion der soliden Tumormasse falls diese entweder raumfordernd oder ohne ein neurologisches Defizit komplett resezierbar ist.

Diese muss unter folgenden Gesichtspunkten geschehen: Die Tumorzellen weisen, wie schon weiter oben beschrieben, ein hohes Invasionspotenzial auf¹⁰⁷, d.h. sie infiltrieren das den Tumor umgebende, gesunde Hirnparenchym und sind auch schon früh in der kontralateralen Hemisphäre zu finden^{30;50}. Des Weiteren wurde anhand einer Studie gezeigt, dass in 96% der Fälle das Rezidiv von einer Glioblastomzelle in einem 3cm-Rand um die Resektathöhle ausgeht⁴⁸. Die Resektion sollte so gut wie möglich funktionelles, vermeintlich gesundes Hirngewebe schonen, aber zugleich steht eine größtmögliche Exzision der Tumormasse mit einer Verbesserung der Lebensqualität des Patienten und dessen Prognose in Zusammenhang^{15;61;108;109}.

Um nun ein bestmögliches operatives Ergebnis zu erzielen, kommt seit geraumer Zeit ein Metabolit namens 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zum Einsatz, der den Patienten im Vorfeld der Operation verabreicht wird, von den Tumorzellen zu fluoreszierendem Porphyrin umgewandelt wird und sich aufgrund der hohen Stoffwechselrate in diesen anreichert. Mittels UV-Licht wird die Fluoreszenz intraoperativ sichtbar gemacht. Eine auf diese Weise vollzogene Resektion führte im Vergleich zu einer ohne 5-ALA abgelaufenen Operation zu einer vollständigeren Entfernung der soliden Tumoranteile und einem längeren progressionsfreien Intervall^{42;114}. Die zusätzlich photosensibilisierende Wirkung von Porphyrin wurde experimentell des Weiteren bereits verwendet, um mit Hilfe stereotaktischer Phototherapie ein entstandenes Glioblastomrezidiv zu behandeln^{111;113}.

Der operativen Intervention folgt eine adjuvante Radiotherapie, die nach neuesten Vorschlägen von einer Chemotherapie mit Temozolomid (3,4-Dihydro-3-Methyl-4-Oxoimidazol, TMZ) begleitet wird¹⁸. Temozolomid ist ein orales Alkylanz und weist geringe Nebenwirkungen auf. Seine Wirkung basiert auf einer Methylierung des DNA-Stranges, die während der Replikation zu einer Fehlanordnung der Basen führt. Studien haben gezeigt, dass Patienten von einer kombinierten Radio-Chemotherapie in höherem Maße profitieren als von einer Strahlenbehandlung alleine^{85;115;116;119}.

Eine mögliche Resistenz gegen dieses Chemotherapeutikum lässt sich durch eine Überexpression des Reparaturenzyms MGMT (O-6-Methyl-Guanin-DNA-Methyl-Transferase) in den Tumorzellen erklären. Dieses Enzym beseitigt die entstandenen Schäden im DNA-Strang und wird nur exprimiert, wenn sein Promotor im DNA-Strang nicht methyliert ist. Patienten mit einem methylierten Promotor und demzufolge weniger MGMT profitieren mehr von einer solchen Therapie als Patienten mit unmethyliertem Promotor. Zudem scheint der MGMT-Status ein therapieunabhängiger prognostischer Faktor zu sein.^{58;59}

Trotz dieser multimodalen Therapieoptionen kommt es in nahezu allen Fällen aufgrund der invasiven Eigenschaften der Tumorzellen zu einem Rezidiv und lässt die mittlere Überlebenszeit eines Glioblastompatienten nach Diagnosestellung im Schnitt 14.6 Monate betragen.¹¹⁷

3.3 Humane mesenchymale Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich durch folgende wesentliche Charakteristika aus: Sie können sich durch Mitose selbst erneuern und durch ihre Differenzierungskapazität zu ausgereiften Zellen werden. Abhängig von ihrem Differenzierungspotenzial lassen sich diese Zellen unterteilen: Unipotente Stammzellen können sich nur zu einem bestimmten ausgereiften Zelltyp differenzieren. Multipotente zu mindestens zwei fetalnen oder adulten Typen. Beispiele hierfür sind mesenchymale oder neuronale Stammzellen. Als pluripotent werden embryonale Stammzellen bezeichnet, die in vitro aus Zellen des Blastozöls gewonnen werden⁸⁶. Totipotente Stammzellen wie die befruchtete Eizelle oder das premorulane Blastomer, können sich in jeden Zelltyp der jeweiligen Spezies differenzieren und sind, anders als die vorher genannten Stammzellen, in ihrer Teilungsfähigkeit unbegrenzt⁵⁷. Als fünfte Kategorie kommen Tumorstammzellen in Betracht.

Die nun hier verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurden erstmals 1966 beschrieben⁴³. hMSCs besitzen als multipotente Stammzellen die Fähigkeit, sich zu einer Reihe von ausgereiften Zelltypen wie Chondrozyten, Osteozyten, Adipozyten, glatten Muskelzellen oder neuronalen Zellen zu differenzieren^{8;79;94}. Diese Eigenschaften wurden bereits experimentell in verschiedenen medizinischen Fachrichtungen genutzt, um ihr Potenzial in der Regeneration von beschädigten Geweben zu eruieren^{69;89;90}.

Wie auch im Falle dieser Arbeit werden hMSCs in der Regel aus dem Knochenmark gewonnen (bmMSC = bone marrow derived mesenchymal stem cell), können aber auch aus anderen Geweben wie Skelettmuskel, Fettgewebe, Synovia^{8;99} oder, wie ebenfalls für diese Untersuchung durchgeführt, aus Tumorgewebe isoliert werden (gbMSC = glioblastoma derived mesenchymal stem cell).

3.4 Experimentelle Therapieoptionen

Wie bereits beschrieben, zeigen die Infiltrationseigenschaften der Tumorzellen dem aktuellen Therapieregime Grenzen auf: Einzelne Tumorzellen infiltrieren das angrenzende Gewebe, entkommen den adjuvanten Therapieprotokollen und sind so für ein Rezidiv verantwortlich. Ein möglicher experimenteller Behandlungsansatz ist es, diese Tumorzellen mittels genetisch veränderter zellulärer Vektoren zu behandeln⁹⁵.

Dabei wurde in der Vergangenheit ein Virusgen (Herpes simplex Virus Thymidinkinase, kurz HSV-tk) mit Hilfe eines teilungsunfähigen Retrovirus in das Genom fibroblastenähnlicher Zellen eingebaut, die als Vehikel *in situ* dienten^{4;101}. Diese Strategie versagte aber aufgrund der geringen Motilität der zellulären Vektoren zum Tumor hin¹⁰⁰.

Dagegen konnten mit von Gliomen angelockten Stammzellen erste erfolgreiche, präklinische Ergebnisse erzielt werden: Murine embryonale neurale Stammzellen (NSC) zum Beispiel zeigen einen ausgeprägten Tropismus hin zu glialen Tumoren und kamen bereits im Tiermodell als Vehikel zum Einsatz^{1;60}. Doch beherbergt die Verwendung von humanen NSCs einige Probleme: Zum einen setzt die ethische Diskussion im Umgang mit embryonalen Stammzellen den Forschungsversuchen Grenzen, zum anderen ist die Möglichkeit, autologe adulte NSCs zu gewinnen, praktisch durch das Risiko für den Patienten während einer Isolation so-

wie durch die geringe erreichbare Menge eingeschränkt. Des Weiteren ist die Tumorgenität embryonaler Stammzellen noch nicht ausreichend eruiert.

Aus diesen Gründen traten in den letzten Jahren humane mesenchymale Stammzellen als Alternative in den Fokus. Diese können vergleichsweise leicht durch eine Knochenmarkspende in größeren Mengen gewonnen werden und stehen so autolog als auch allogen zur Verfügung, da die bmMSCs im Anschluss an das eigentliche Ziel einer Knochenmarkspende, der Gewinnung von Blutstammzellen, auch noch aus den Resten der Spende isoliert werden können. Hierbei bringt die größere Verfügbarkeit durch eine mögliche allogene Transplantation jedoch auch die Risiken einer Abstoßungsreaktion mit sich. Ein weiterer Vorteil der auf diese Weise gewonnenen bmMSCs ist die Reproduktion mittels Zellkultur.

Es konnte gezeigt werden, dass hMSCs in vitro aktiv zu glialen Tumoren wandern, beide Zelltypen mit Blick auf Invasionseigenschaften miteinander interagieren und das es zu einer verstärkten Invasion und Migration von mesenchymalen Stammzellen in der Umgebung von Botenstoffen kommt, die von Gliomen sezerniert werden¹⁰⁶. Einen besonderen Einfluss hatte der Faktor VEGF, der, wie bereits beschrieben, auch in der Angiogenese eines hypoxischen Tumorareals eine bedeutende Rolle spielt. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von VEGF hMSCs eine Differenzierung in Richtung eines Endothelzelltyps durchlaufen und endothelspezifische Marker wie KDR (VEGF Rezeptor-2 Gen), Flt-1 (VEGF-Rezeptor) oder vWF (von-Willebrand-Faktor) exprimieren⁴⁴. Des Weiteren konnte in einem tierexperimentellen Modell gezeigt werden, dass sich mesenchymale Stammzellen in ein neu bildendes Gefäßsystem eines Tumors integrieren können^{6;62}.

Da ein Glioblastom ein hochvaskularisierter Tumor mit einer ausgeprägten Neoangiogenese ist, scheinen mesenchymale Stammzellen als Vektoren einer Gentherapie vielversprechend und die Interaktion von Stamm- und Gliomzellen auf zellulärer Ebene einer genaueren Be- trachtung wert.

3.5 Grundlegende zellphysiologische Eigenschaften

Hier sollen im Vorfeld noch einige grundlegende zellphysiologische Eigenschaften erläutert werden, die zum Verständnis der Arbeit beitragen.

Zellen besitzen verschiedene Möglichkeiten miteinander in Kontakt zu treten und zu kommunizieren. Dieser Austausch kann Nährstoffe wie Glukose, Aminosäuren oder Elektrolyte, die zum Erhalt der Vitalität notwendig sind, oder Informationen wie RNA-Bausteine oder Hormone betreffen, die die Zellen interagieren lassen. Neben dem Aussenden von Botenstoffen in Form von Hormonen oder anderer Signalmoleküle, können Zellen auch direkt Kontakt miteinander aufnehmen.^{53;98}

3.5.1 Gap junctions

Eine Möglichkeit sind Zell-Zell-Kanäle, kanalbildende Proteinkomplexe, auch gap junctions genannt, die das Zytosol zweier Zellen miteinander verbinden. Jede Zelle steuert eine Hälfte des Kanals, ein Connexon bei. Dieser wird wiederum aus sechs Connexinen (Cx) aufgebaut. Die so entstehende Pore hat einen Durchmesser von ca. 1,5nm und erlaubt im geöffneten Zustand Molekülen von maximal 1000 Dalton Masse den Durchtritt. Dies können geladene oder ungeladene Substanzen wie Ionen, Wasser, Glucose, Aminosäuren, Nukleotide (ATP, cAMP) oder auch siRNA (short interfering RNA) sein.^{53;131}

Gap junctions wurden in nahezu allen Zelltypen und Geweben nachgewiesen. Ausnahmen bilden einige Zellarten wie Erythrozyten, Spermatozoiden und einige Neurone¹³⁰. Darüberhinaus variieren die vor kommenden Connexinstrukturen und erlauben ihre Einteilung durch ihr unterschiedliches Molekulargewicht, das sich in ihrem Namen wiederfindet (z.B. Cx43 mit 43kDa)¹⁶. Untersuchungen legen nahe, dass der Aufbau der Connexine Rückschluss auf die

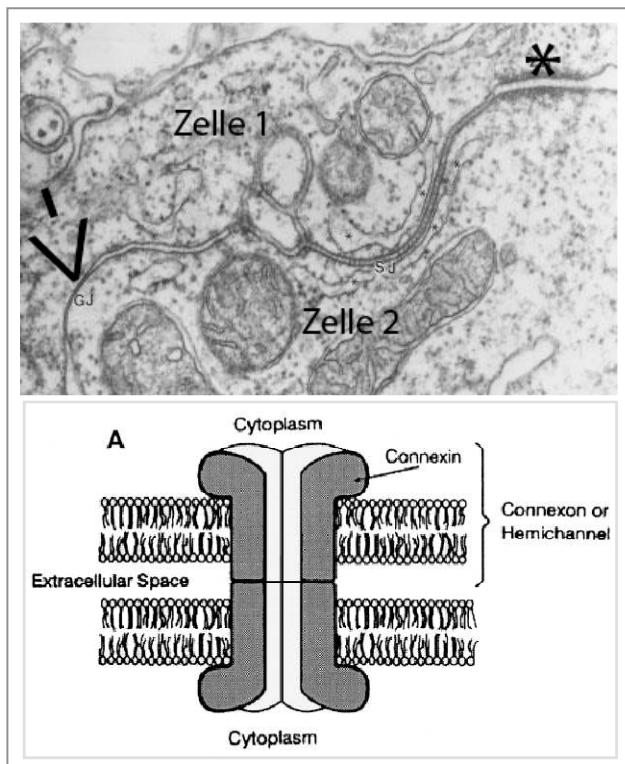


Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer gap junction übernommen aus journal of morphology⁷: Eine gap junction (->) verbindet die beiden Zellen, vgl. auch Unterschied zu einer zona adhärens (*) sowie topologisches Modell des gap junction Kanals übernommen aus cell biology international³¹: Connexine bilden ein Connexon/Hemichannel einer Zelle, zwei Connexone von zwei Zellen bilden eine gap junction

Aktivität der gap junctions gibt. Je nach molekularer Struktur der Connexine baut sich ein unterschiedlich starkes und unterschiedlich gerichtetes Spannungsfeld über die Proteinstruktur auf. Eine auf einander abgestimmte Polarität zweier unterschiedlicher Connexone führt zu einer Öffnung des Kanals und damit zu vermehrten Aktivität über der zustande kommenden gap junction.^{32;53;129} Nach welchen Prinzipien diese Kombinationen geschehen und welcher funktionelle Zusammenhang insbesondere im connexinreichen Nervensystem daraus entstehen könnte, ist Inhalt aktueller Forschungsbemühungen.

3.5.2 Zellfusion

Eine weitere Möglichkeit ist die Zellfusion, die Verschmelzung der Plasmamembran zweier Zellen. Diese kann von partiellem Charakter sein³⁵, das heißt, es werden Membran- und Zytoskelettabestandteile ausgetauscht. Oder es kommt zu einer kompletten Fusion, bei der aus zwei Zellen eine wird, ein strukturelles Synzytium entsteht.

Zellfusionen spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen: Die Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium, bei der Entwicklung eines Synzytiums der Plazenta oder die Entstehung von Riesenzellen, zum Beispiel Osteoklasten im Zuge des Knochenstoffwechsels²¹. Trotz all der Beispiele ist die Zellfusion immer Gegenstand aktueller Forschung, auf der Suche nach den auslösenden Faktoren.

4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktionsmöglichkeiten von humanen mesenchymalen Stammzellen mit Gliom- und Gliomendothelzellen vor dem Hintergrund eines möglichen Einsatzes von hMSCs als therapeutische Vehikel zu untersuchen.

Die Integration von Stammzellen in ein Tumorgefäßsystem soll in vitro mittels tube formation assays quantifiziert werden.

Des Weiteren wird darauf eingegangen, inwieweit hMSCs über verschiedene Zellkontaktarten mit Gliomzellen interagieren und welchen Einfluss dies auf beide Zelltypen hat. Der Austausch von Substanzen via gap junctions wird ebenso wie die partielle wie komplette Zellfusion untersucht. Hierzu dienen in-vitro-Färbemethoden und immunzytochemische Ansätze. Weiterführend werden die möglichen Auswirkungen dieser Interaktionen auf zellphysiologische Eigenschaften wie Migration in einem Sphäroidmodell eruiert, das in seinem Aufbauschema näher an den in vivo vorherrschenden Bedingungen liegt als die reine Monolayer-Zellkultur.

Zudem wird in vivo das Potenzial von bereits zu therapeutischen Zwecken genetisch modifizierten Stammzellen weiter untersucht sowie die im Anschluss gewonnenen Hirnresektate weiter immunhistochemisch analysiert.

5 Material

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Reagenzien, Zellarten sowie Versuchstierarten zur Dokumentation aufgelistet.

5.1 Zellversuche

5.1.1 Geräte und Laborhilfen

Autoklav	KSG
BioPhotometer	eppendorf
Blockthermostat BT 1301	HLC
Brutschrank CB150	Binder
Digitalkamera Power Shot G2	Canon
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nunc
Entwicklermaschine Scopix LR 5200	Agfa
Fluoreszenzfilterset	Zeiss
Folienschweißgerät Folio	Severin
Gefrierschrank -80°C HFU 86 450	Heraeus
Gefrierschrank Premium	NoFrost
Glashomogenisator	Braun
Glasmesszylinder	Schott
Handstückzähler mechanisch	VWR
Kühlschrank Comfort	Liebherr
Kühlschrank Economy	Liebherr
Kurzzeitmesser (Stoppuhr)	VWR
Lamina flow hood Hera safe	Heraeus
Magnet Particle Separator	Roche
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Messgläser	VWR Brand

Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Mikroskop wilovert s	Hund
Mikrowellenherd	Toshiba
MilliQ-biocel A10	Millipore
Minishaker MS2	IKA Labortechnik
Multipipette research pro	eppendorf
OP-Besteck	Med. Lager
pH-Elektrode Sen Tix 41	VWR
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	eppendorf
Pipettierhilfe Easypet	eppendorf
Power Pac 3000	Bio Rad
Quecksilberlampe mbq 52 ac	Zeiss
Röhrchengestell	TPP
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Schutzbrille	Carl-Roth
Sicherheitswerkbank Hera safe	Heraeus
Stickstofftank Chronos	Messer
Waage AG204	Mettler Toledo
Waage PB 3002	Mettler Toledo
Wärmeschrank	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Zählkammer, Neubauer improved	VWR
Zellsuspensionsrotator	Labor Brand
Zentrifuge 1-15	Sigma
Zentrifuge 5415 R	eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich

5.1.2 Verbrauchmaterialien

Deckgläser	Menzel
Einmal-Küvetten	Brand
Eppis (0,2, 0,5, 1,5, 2,0 ml)	TPP
Fiberpads (8 x 11 cm)	Bio-Rad
Flachbeutel PE ohne Schreibf. 115 x 155 mm	Boll
Gelfärbeschalen MIDI 143x100x25mm	Roth
Hamilton 705N, 50 ul, Spitzentype 3	Hamilton
Immun-Blot PVDF-Membran (26 cm x 3,3 m)	Bio-Rad
Lab Tec chamber slides mit Borosilicate	Nunc
Küvette PS 10x10x45mm, Lichtweg 10mm	WL
Mikrotiterschalen 96 well	Nunc
Mini Trans Blot Filter Paper (7,5 x 10 cm)	Bio-Rad
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfercell	Bio-Rad
Multischalen (6, 12, 24 well)	Nunc
Objektträger	Dako
Parafilm	Pechiney
Perfusorspritzen	Braun
Petrischalen	Nunc
Pipette mit serol. Wattestopfen (2, 5, 10, 25 ml)	Costar
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	eppendorf
Gel für Polyacrylamid Electrophoresis (4-20%, 7,5%, 10%)	Bio-Rad
Röhre Nunc Cryo 1,8ml mit Schreibfeld (Cryoröhrchen)	Nunc
Röntgenfilm Super X-Ray RX 18 x 24 cm	Fuji
Safe Skin Handschuhe groß (L)	Semperit
Universal Indikatorstäbchen pH 0 – 14	VWR
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²)	Nunc
Zellschaber	Nunc
Zellsiebe (40, 70, 100 µm)	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP

5.1.3 Reagenzien

Antibody Diluent	Dako
β -Mercaptoethanol	Sigma
Biocoat Matrigel	Schubert & Weiß
Bromphenolblau	Sigma
Bradford Dye Reagenz	Bio-Rad
Brilliant Blue R Dye content ~90 %	Sigma
BSA Standard Kit	Bio-Rad
BSA - bovines Serumalbumin	Fluka
Calcein Blue AM	Molecular Probes
Calcein-AM	Molecular Probes
CCD1064SK cell-lysate	Santa Cruz
Citrat-Puffer	Merck
Collagenase/ Dispase	Roche
DAPI	Sigma
Dextran	Sigma
dextran, tetramethylrhodamine, 10.000 MW, neutral	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR
DL- Dithiothreitol (DTT)	Fluka
DNAse	Roche
Dulbecco's PBS (DPBS)	Cambrex
EDTA	Sigma
Eosin	Sigma
Ethanol 100, 96, 70%	Roth
Eukitt	Sigma
Fast Dil solid	Molecular Probes
Fast DiO	Molecular Probes
Fibronectin	Sigma
Ficoll Paque Plus	Sigma-Aldrich
Gelatine 45%in water from cold water fish	Sigma

Glycerol	Sigma
Glycine	Sigma
Glycyrretinic Acid (AGA)	Sigma
Hämalaun nach P. Mayer	Merck
HCl	Sigma
HeLa Cell Lysate 1 mg/ml 500 µg	BD Transduction Laboratories
HISTOPAQUE-1077	Sigma
human Angiopoetin2 Protein	R&D Systems
Immunhistochemie-Set	Dako
Immunstar Luminol Enhancer und HRP Peroxid-Puffer	Bio-Rad
Laminin (from human placenta)	Sigma
Lämmli Sample Buffer	Bio-Rad
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
Magnetic beads	Dynal
Methanol reinst	Sigma
Milchpulver (Nonfat milk)	Roth
NaOH 0,2M	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Noble Agar	Sigma
Nonidet 40 Lysepuffer	Sigma
Organelle Lights Mito-GFP	Invitrogen
Organelle Lights PM-OFP	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Sigma
PBS Puffer pH 7,4 (10x)	Biochrom
PIK (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Sigma
PMSF	Sigma
Polyoxyethylensorbit (= Tween 20)	Sigma
Ponceau S-Lösung	Sigma
Protein Block	Dako
Qtracker 525 Cell Labeling Kit (green fluorescent)	Invitrogen
Qtracker 525 Cell Labeling Kit (red fluorescent)	Invitrogen

Rat-brain-extract	Santa Cruz
Rat-liver-extract	Santa Cruz
Remixed 10x TRIS/Glycine Buffer	Bio-Rad
SDS-Lösung (10%)	Sigma
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
Tris (TRIZMA Base)	Sigma
Triton X-100	Fluka
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma
Xylool	Roth

5.1.4 Zellkultur Medien und Zusätze

Antibiotics	provitro
Amphotericin B (250µg/ml)	Biochrom
Ciprofloxacin (200mg/ml)	Bayer
Dulbecco's MEM	Biochrom
Eagle's MEM	Biochrom
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium	provitro
FCS – Fötale Kälberserum	Biochrom
Gelatine (10 mg/ml)	Biochrom
Genitcin (50mg/ml)	Gibco
M199	Biochrom
MEM NEAA (100x)	Invitrogen
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom
Penicillin (500 µg/ml) – Streptomycin (5000 µg/ml) – L-	Invitrogen
Glutamin (29,2 mg/ml) - Lösung	
Supplement Pack	provitro
Trypsin/ EDTA (10x) (0,5%/0,2%)	Biochrom
VLE-RPMI 1640	Biochrom

5.1.5 Antikörper

Anti-Goat IgG-Peroxidase – rabbit	Sigma
Anti-Mouse IgGfc-Peroxidase – goat	Sigma
Anti-Rabbit IgG-Peroxidase – goat	Sigma
CD31+ anti-human (mouse)	Acris
CD31+/PECAM-1 anti-human (mouse)	R&D
CD31+/PECAM-1 anti-human (mouse)	Serotec
Connexin 26/30/32 anti-human (rabbit)	Santa Cruz
Connexin 32 anti-human (goat)	Santa Cruz
Connexin 36 anti-human (rabbit)	Santa Cruz
Connexin 37 anti-human (goat)	Santa Cruz
Connexin 40 anti-human (goat)	Santa Cruz
Connexin 43 anti-human (goat)	Santa Cruz
Connexin 45 anti-human (goat)	Santa Cruz
FITC anti-goat (rabbit)	Sigma-Aldrich
FITC anti-mouse (rabbit)	Sigma-Aldrich
FITC anti-rabbit (goat)	Sigma-Aldrich
Peroxidase konj. Anti β-Actin	Santa Cruz
SV40 T-Antigen anti-human (mouse)	Calbiochem
Texas Red anti-goat (rabbit)	Linaris
Texas Red anti-mouse (horse)	Linaris
Texas Red anti-rabbit (goat)	Linaris

5.1.6 Zelllinien

Stammzellen

hMSC	Lonza
Knochenmark isol. hMSC / bmMSC	-
Glioblastom isol. hMSC / gbMSC	-

L87	Med. Poliklinik - Biochemie
L87-Tie2-RFP	Med. Poliklinik - Biochemie
L87-Tie2-Tk	Med. Poliklinik - Biochemie
Tumorzellen	
U87	ATCC
U251	ATCC
U373	ATCC
U373 GFP	-
Tumorendothelzellen	
CD31+ isol / GB-EC	-
Kontrollzellen	
Astrozyten	ATCC
HUVEC	Provitro

Humane mesenchymale Stammzellen wurden zum einen Teil von der Firma Lonza bezogen und zum anderen Teil nach den im Kapitel Methoden unter „Isolation von GB-ECs, bmMSCs und gbMSCs“ beschriebenen Protokollen aus Knochenmarksspenden oder Tumorgewebe isoliert.

Die Stammzellen der medizinischen Poliklinik München, Abteilung Biochemie, wurden aus humanem Knochenmark isoliert. Ihre Immortalisierung gelang mit Hilfe des SV40 large-T antigen⁷⁰. Im Anschluss wurden die Zellen mittels eines non-viralen Gentransfers entweder mit den Gensequenzen der Thymidinkinase (tk) oder des Red-Fluorescent-Proteins (RFP) transfiziert. Beide wurden unter die Kontrolle des Tie2-Promotors lokalisiert. Dieser Promotor stellt sicher, dass die Proteine nur in endothelial differenzierten MSCs (mesenchymale Stammzellen) exprimiert werden. Die Thymidinkinase bewirkt in Anwesenheit des Prodrugs Ganciclovir eine Umwandlung desselben. In seinem aktivierte Zustand führt Ganciclovir zu Apoptose der betroffenen Zellen.

Die Tumorlinie U373 wurde mit einem Green-Fluorescent-Protein (GFP) stabil transfiziert¹⁰⁷. Da diese Zellen nun ebenso über eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geniticide verfügen, konnte mit Hilfe desselben in bestimmter Konzentration (24µl/ml Medium) durch Selektionsdruck der Erhalt der reinen U373-GFP-Kultur gewährleistet werden.

Glioblastomendothelzellen (GB-ECs) wurden nach dem im Kapitel Methoden unter „Isolation von GB-ECs“ erläuterten Protokoll aus Tumorgewebe selbst isoliert.

Die käuflich erworbenen Zelltypen Astrozyten und HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) dienten als Vergleich der Gliomzellen mit Normalgewebe.

5.2 Tierexperimente

5.2.1 Geräte

Handbohrer	Proxxon
Inkubatorschrank Uni Protect	Ehret
Luftbefeuchter Compact	Burg
Model Small Animal Stereotaxic OP	Kopf Instruments
Narkoseglocke	Harlan
Tierkäfige	Harlan
Tier-Anästhesiegerät Titus S-ORC	Dräger
Vapor-Narkosemittelverdampfer	Dräger

5.2.2 Verbrauchsmaterialien

Befeuchterwasser Ampuwa (Aqua dest)	Fresenius
Einmal-Rasierer	wmmed
Ethanol 70% reinst	Roth
Jelu-Flock Kleintierstreu bestrahlt	Harlan
Knochenwachs	Ethicon
Kopfhaube	Medinette
Leitungswasser sterilisiert (Trinkwasser)	Hausapotheke
Microlance 3 Nadeln	BD
Mikroliterspritze Typ 701N 10µl	Hamilton
Molltextücher	Omega

Mundschutz	Omega
OP-Instrumente	Med. Lager
Safe Skin Handschuhe groß (L)	Semperit
Skalpelle steril No 11, 15, 20, 23	Feather
Spritze 1ml ohne Kanüle, Injekt-F solo	Braun
Spritzen Injekt 5ml	Braun
Stielstupfer klein	Braun
Supolene gefl. DSM 27 2/0 45cm 3 metric	Ethicon
Tierfutter Teklad Global 18% Protein Rodent Diet be-strahlt	Harlan
Venenverw. Kanüle mit Flügel	Ohmeda

5.2.3 Medikamente

Ether DAB 10	Otto Fischar
Ganciclovir Afl	Roche
Isofluran	Abbott
Ketamin-HCl (Ketavet), 100 mg/ml, IFL	Ratiopharm
NaCl 0,9 % (Plastik)	Braun
Rompunlösung, 2%	Bayer

5.2.4 Versuchstiere

Nacktratte HSD: <i>rh</i> -rnu	Harlan
--------------------------------	--------

6 Methoden

Die auf den weiterführenden Seiten beschriebenen Methoden stellen zum einen von Standardprotokollen für das Gelingen dieser Arbeit modifizierte Vorgehensweisen dar oder wurden zum anderen im Rahmen dieser Arbeit neu konzipiert.

6.1 Zellbiologische Untersuchungen

6.1.1 Mediumwahl

Je nach Zelltyp wurden unterschiedliche Medien und Zusatzstoffe verwendet.

- Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, KM-isol. hMSC, Tu-isol. hMSC)
380ml Dulbecco's MEM (Biochrom)
5ml MEM NEAA 100X (Invitrogen)
5ml Natrium Pyruvat 100nM (Biochrom)
5ml Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Amphotericin B (Biochrom)
100ml FCS (Biochrom)
- Transfizierte Stammzellen (L87, L87-Tie2-RFP, L87-Tie2-Tk)
430ml VLE-RPMI 1640 (Biochrom)
5ml MEM NEAA 100X (Invitrogen)
5ml Natrium Pyruvat 100nM (Biochrom)
5ml Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Amphotericin B (Biochrom)
50ml FCS (Biochrom)
- Tumorzelllinien (U87, U251, U373)
430ml Dulbecco's MEM (Biochrom)

5ml MEM NEAA 100X (Invitrogen)
5ml Natrium Pyruvat 100nM (Biochrom)
5ml Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Amphotericin B (Biochrom)
50ml FCS (Biochrom)

- Transfizierte Tumorzelllinie (U373GFP)

430ml Dulbecco's MEM (Biochrom)
6ml Geniticide (Gibco)
5ml MEM NEAA 100X (Invitrogen)
5ml Natrium Pyruvat 100nM (Biochrom)
5ml Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Amphotericin B (Biochrom)
50ml FCS (Biochrom)

- Endothelzellen (GB-EC, HUVEC)

500ml Microvascular Endothelial Growth Medium (provitro)
38ml Supplement Pack (provitro)
3,5ml Antibiotics (provitro)

- Astrozyten

430ml Eagle's MEM (Biochrom)
5ml MEM NEAA 100X (Invitrogen)
5ml Natrium Pyruvat 100nM (Biochrom)
5ml Penicillin G / Streptomycin / L-Glutamin (Invitrogen)
5ml Amphotericin B (Biochrom)
50ml FCS (Biochrom)

- Einfriermedium

40ml Dulbecco's MEM (Biochrom) inclusive 10% FCS
40ml FCS (Biochrom)

20ml DMSO (VWR)

- Isolationsmedium

437,5ml M199 (Biochrom)

50ml FCS (Biochrom)

12,5ml Penicillin G / Streptomycin (Invitrogen)

6.1.2 Kultivieren von Zellen

Alle Zelltypen wurden in ihrem jeweiligen Medium in Zellkulturflaschen mit variabler Größe im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Wachstum und der Zustand der Zellen wurden täglich mit einem Durchlichtmikroskop kontrolliert.

Der Mediumwechsel und das Passagieren geschah unter einer Laminar Air Flow Werkbank unter sterilen Bedingungen folgendermaßen: Zu Beginn wurden alle benötigten Reagenzien, die bei 4°C gelagert wurden, in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium wurde entfernt. Es folgte ein Waschschritt mit PBS in gleicher Menge. Bei einem Mediumwechsel wurde nun dieselbe Menge Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellkulturflaschen zurück in den Inkubator gestellt. Waren die Zellen zu ca. 80% konfluent, wurden sie mit einer 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom) bedeckt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden in 10ml Medium resuspendiert und je nach Wachstumsdichte und absehbarem Verwendungszeitpunkt im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt und bis zur ursprünglichen Mediummenge wieder aufgefüllt. Die überschüssigen Zellsuspensionen wurden verworfen, eingefroren oder fanden in Experimenten Anwendung.

6.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Beim Ansetzen von Experimenten ist es sinnvoll, die genaue Zahl der verwendeten Zellen zu bestimmen, um reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten zu können. Hierzu wurden die Zellen mit einer 0,05% Trypsin/EDTA-Reagenz gelöst und diese Suspension in einem 15ml

Falcon mit der dreifachen Menge an Medium gemischt. Anschließend wurden sie 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 1ml des dem Zelltyp entsprechenden Mediums auf das Zellpellet gegeben. Der Inhalt wurde nun mittels Vortex durchmischt. In einem well einer Mikrotiterplatte wurden nun 50µl der Suspension mit 50µl Trypanblau (Sigma) gemischt. Trypanblau dient dem Erkennen von noch vitalen Zellen im Durchlichtmikroskop. Je nach Pelletgröße konnten 50µl der jeweilig höheren Mischung nochmals mit derselben Menge Farbstoff gemischt werden, um die Verdünnung zu erhöhen. Nun wurden 10µl der Endverdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die vier Quadranten ausgezählt und die durchschnittliche Zellzahl bestimmt. Durch die Formel „errechneter Durchschnitt x Verdünnung x 10 000“ ließ sich die Zellzahl pro ml kalkulieren.

6.1.4 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen

Beim Einfrieren der Zellen erfolgten die gleichen Schritte wie beim Bestimmen der Zellzahl, nur das Pellet wurde nach der Zentrifugation bei 4°C in 1ml vorgekühltem Einfriermedium, bestehend aus 40% Vollmedium, 40% FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO), aufgenommen. Nach Erfassen der Zellzahl wurden ca. 500 000 Zellen, suspendiert in 1ml Einfriermedium, in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden langsam in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff herunter gekühlt und nach eintägiger Zwischenlagerung bei -80°C in einen Tank mit flüssigem Stickstoff umsortiert, um eine zeitlich unbegrenzte Lagerung zu ermöglichen. Beim Auftauen wurde das Kryoröhrchen langsam im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis dessen gefrorener Inhalt langsam in den flüssigen Zustand übertritt. Die noch kalte Suspension wurde aufgenommen und in eine 75cm² Kulturflasche mit vorgewärmten Medium langsam pipettiert. Nach einem Tag erfolgte der erste Mediumwechsel, um das restliche, noch vorhandene DMSO zu entfernen.

6.1.5 Gelatinebeschichtung von Zellkulturflaschen

Um Endothelzellen optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten wurden die Böden der Zellkulturflaschen für diese Zellarten mit einer Gelatineschicht überzogen. Die Gelatine aus Schweinehaut (10mg/ml, Biochrom) wurde im Wasserbad bei 37°C verflüssigt und pro 10cm² Fläche wurde 1ml Gelatine in die Kulturflaschen pipettiert. Anschließend wurde die Flasche 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, damit sich die Matrix am Flaschenboden absetzen konnte. In Folge wurde die verbliebene Lösung abpipettiert und die Kulturflasche einmalig vor ihrer Verwendung mit PBS gewaschen.

6.1.6 Herstellung von stammzellkonditioniertem Medium

Die Herstellung von stammzellkonditionierten Medien diente dem Nachweis einer möglichen Wirkung des Stammzellüberstandes auf die Wachstumseigenschaften von Tumorendothelzellen in einem Tube Formation Assay. Hierbei wurde eine mit Stammzellen konfluent besiedelte 75 cm² Kulturflasche mit dem entsprechenden Zellkulturmedium über 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgenommen und in der Zentrifuge bei Raumtemperatur und 1200 U/min 5 Minuten weiterverarbeitet. Der Überstand wurde abgenommen und ungefiltert bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.1.7 Isolation von GB-ECs, bmMSCs und gbMSCs

6.1.7.1 Isolation von GB-ECs

Diese von Miebach et al. etablierte Methode dient der Isolation von Tumorendothelzellen (GB-ECs = Glioblastom-Endothelzellen) aus einem Gliomresektat mittels eines magnetic bead Systems, bei dem ein primärer Antikörper an kleine magnetische Kugeln mittels einer DNA-Kette gekoppelt wird und die von diesem als positiv erkannten Zellen mit Hilfe eines Magneten aus einer Zellsuspension isoliert werden⁸³.

Hierbei wurde vitales Glioblastomgewebe von einem Neurochirurgen mikroskopisch reseziert und anschließend unter sterilen Bedingungen auf Eis gelagert zur Weiterverwendung transportiert. Es wurde nur solides Tumorgewebe genutzt, um auszuschließen, dass gesundes Endothelgewebe aus der Infiltrationszone des Tumors oder Nekroseareale mit in den Isolationsvorgang gelangt.

Unter einer Laminar Air Flow Werkbank wurden nun mit einem Skalpell alle Meningenreste und sichtbaren, großen Gefäße entfernt und das Gewebe grob zerkleinert. Um ein Austrocknen des Resektats zu verhindern, wurden 5ml gekühltes Isolationsmedium hinzugegeben. Anschließend wurden die Resekttatstücke in 15ml desselben Mediums aufgenommen und in einem Glashomogenisator bearbeitet, bis keine Gewebereste mehr sichtbar waren.

Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcon gegeben und bei 4°C und 2200 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde nochmals zentrifugiert, um eine maximale Ausbeute zu garantieren. Die beiden Zellpellets wurden in 40ml M199-Medium aufgenommen, in dem vorher 6g Dextran gelöst wurden, um eine 15% Dextran-Lösung herzustellen. Diese wurde abermals bei 4°C und 400 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der Schritt dient der Entfernung des Myelins, das nach der Zentrifugation als weiße Schicht dem Überstand aufsitzt. Diese und der Überstand wurden verworfen. Das Pellet wurde in 40ml Isolationsmedium aufgenommen, bei 4°C und 2200 U/min 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Die Zellen wurden nun in 10ml steril filtriertes M199-Medium resuspendiert, das mit 100µl Collagenase-Dispase-Lösung (Konzentration: 1mg/ml) versetzt worden war und nun in einer 75cm² Zellkulturflasche 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Diese Enzyme dienen dazu, Verbindungen zwischen den Zellen zu lösen und eine Einzelzellsuspension herzustellen.

In der Zwischenzeit wurden die magnetic beads mit dem entsprechenden Antikörper nach Herstellerinformationen vorbereitet: 25µl der Lösung mit Anti-Mouse-IgG beads (Dynal) wurden mit 1ml einer PBS / 0,1% BSA Mischung in ein Eppendorf-Cup gegeben, gewaschen und mit einem Magnet Particle Separator wurden die beads anschließend wieder konzentriert. Der Überstand wurde abgenommen. Die magnetic beads wurden in 25µl der BSA-Lösung aufgenommen und 2µl eines CD31+ anti-human-Antikörpers (mouse, 1mg/ml, Serotec) hinzugegeben. Das CD31+ Antigen gilt als Endothelzellmarker⁶⁶. Damit sich die beads mit dem Antikörper verbinden, wurde die Suspension nun 30 Minuten bei Raumtemperatur

in einem Zellsuspensionsrotator bewegt. Es folgte ein abermaliger Waschschritt mit 0,1%-BSA-Lösung, um die überschüssigen Antikörper, die sich nicht mit beads verbunden haben, zu entfernen.

Die Zellen wurden nun nacheinander durch einen 100µm- und einen 40µm-Filter pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu garantieren. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 2200 U/min für 6 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1ml kaltem Isolationsmedium aufgenommen. Die Antikörper-beads-Lösung wurde hinzugegeben und bei 4°C 30 Minuten rotiert. Die kalte Umgebung verhindert die Phagozytose der beads durch die Zellen.

Anschließend wurden die durch bead-Antikörper-Kombination erfassten Zellen durch den Magnet Particle Separator der Firma Roche aus der Suspension isoliert und der Überstand abgenommen. Es folgten zwei Waschschritte mit Isolationsmedium, um die nicht mit Antikörper beladenen Zellen zu entfernen. Das verbliebene Pellet wurde in 400µl vorgewärmtem Endothelzellmedium resuspendiert und 8µl DNase (50 units DNase/µl, Roche) hinzugegeben. Dieses Enzym trennt die DNA-Kette zwischen den beads und den Antikörpern. Die Suspension wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur rotiert. Hier fördert die Temperatur in erster Linie die Enzymleistung. Durch scharfes Pipettieren wurde die Trennung ebenfalls unterstützt. In Folge wurden nun die beads durch den Magneten aus der Lösung isoliert. Diese wurde nun mitsamt der in ihr enthaltenen Zellen abgenommen und in eine mit entsprechendem Endothelzellmedium vorbereitete und beschichtete 25cm² Zellkulturflasche pipettiert und im Brutschrank inkubiert. Die verbliebenen beads wurden ebenfalls in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche pipettiert, um nicht eventuell durch die DNase von den beads getrennte Zellen zum Wachstum zu bringen.

6.1.7.2 Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen

6.1.7.2.1 Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark

Diese von Böyum erstmals beschriebene und seither modifizierte Methode¹⁴ diente der Gewinnung von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmarkproben (Abb. 2).

Reste von Knochenmarkspenden, die normalerweise verworfen werden, wurden von der Aktion Knochenmarkspende Bayern e.V. in Gauting bezogen und ihre Weiterverwendung fand nach entsprechendem Ethikverfahren und mit Wissen und Einverständnis der Spender statt.

Die steril transportierten Spenden wurden unter einer Laminar Air Flow Werkbank geöffnet und in das Schlauchsystem der Spendenbeutel wurden 90ml Stammzellmedium zur Verdünnung eingeführt. Nach mehrmaligem Spülen wurde die Suspension aufgenommen und über zwei Filter der Porengröße 70µm und 40µm in 50ml Falcons pipettiert.

Daraufhin wurden der Spendermenge entsprechend 50ml Falcons mit Histopaque 1077 (Sigma) bei Raumtemperatur vorbereitet. Histopaque ist eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, die auf eine Dichte von $1,077 \pm 0,001$ g/ml eingestellt ist. Es wurden 15ml in ein Falcon gegeben. Um ein Verhältnis von 1:2 zu ermöglichen, wurden nun 30ml der Zellsuspension langsam auf das Histopaque pipettiert, ohne dabei die zwei Lösungen zu vermischen. Diese wurden bei 12°C und 1500 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert. Es war auf das Abschalten der Zentrifugenbremse zu achten, um beim Auslaufen derselben den entstandenen Gradienten nicht zu stören. Während der Zentrifugation sind die diversen in der Knochenmarkspende vorkommenen Zellen je nach ihrem zelltypischen Gewicht unterschiedlich weit durch die Histopaque-Lösung der Zentrifugalkraft gefolgt und haben sich in verschiedenen Schichten abgelagert. Mesenchymale Stammzellen befinden sich auf der Skalenhöhe 12,5 - 22,5ml. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und besagte Schicht abpipettiert. Diese wurde in 10ml Medium aufgenommen und erneut bei 12°C 1500 U/min 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert, um die Histopaque-Lösung zu eliminieren. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Das verbliebene Pellet wurde mit 10ml Stammzellmedium der Firma Biochrom vermischt und in einer 75cm² Zellkulturflasche in den Inkubator zum Anwachsen der Zellen gestellt.

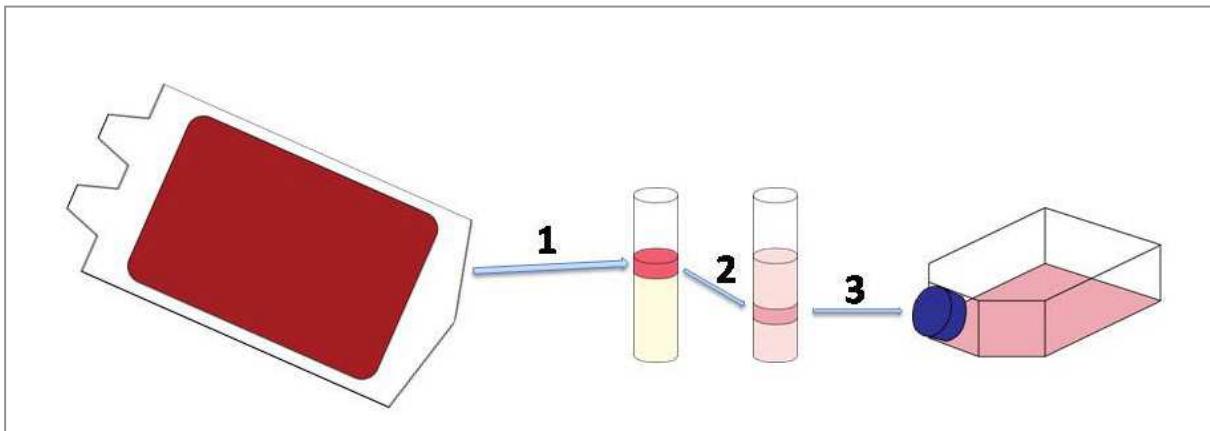


Abb.2: Isolation von hMSC aus Knochenmarkspende:

- 1: Die Blutspende wird in einem Falcon auf Histopaque-Lösung geschichtet
- 2: Nach Zentrifugation befinden sich die hMSC in einer Schicht bei 12,5 – 22,5 ml
- 3: Die hMSC werden abpipettiert und in einer Zellkulturflasche inkubiert

6.1.7.2.2 Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Tumorresektaten

Die Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus Tumorgewebe stellt eine Kombination der beiden zuvor beschriebenen Methoden dar. Das von einem Neurochirurgen resezierte makroskopisch für vital und frei von Nekrosen eingestufte Tumorresektat wurde zu Teilen im Institut für Neuropathologie aufgearbeitet und dort ebenso für vital eingestuft sowie steril transportiert im tumorbiologischen Labor wie bei der Isolation von Tumorendothelzellen mechanisch aufbereitet und in Stammzellmedium homogenisiert. Nun erfolgte bereits die Zugabe der Collagenase-Dispase-Lösung (Konzentration: 1mg/ml) und die zweistündige Inkubation bei 37°C, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Diese wurde über zwei Zellsiebe der Porengröße 70µm und 40µm pipettiert, um eventuell verbliebene Zellkonglomerate abzufangen.

Die Zellen wurden nun, wie zuvor bei der Isolation aus Knochenmarkspenden beschrieben, mit Hilfe der Histopaque-Lösung zentrifugiert, die entsprechende Schicht extrahiert und die selektierten Zellen durch zweimaliges Waschen mit Stammzellmedium der Firma Biochrom und anschließender Zentrifugation von den Resten des Histopaques befreit. Das Pellet wurde wiederum in Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche inkubiert (Abb. 3). Das Anwachsen der Zellen sprach darüberhinaus für die initiale Resektion von vitalem Tumorgewebe.

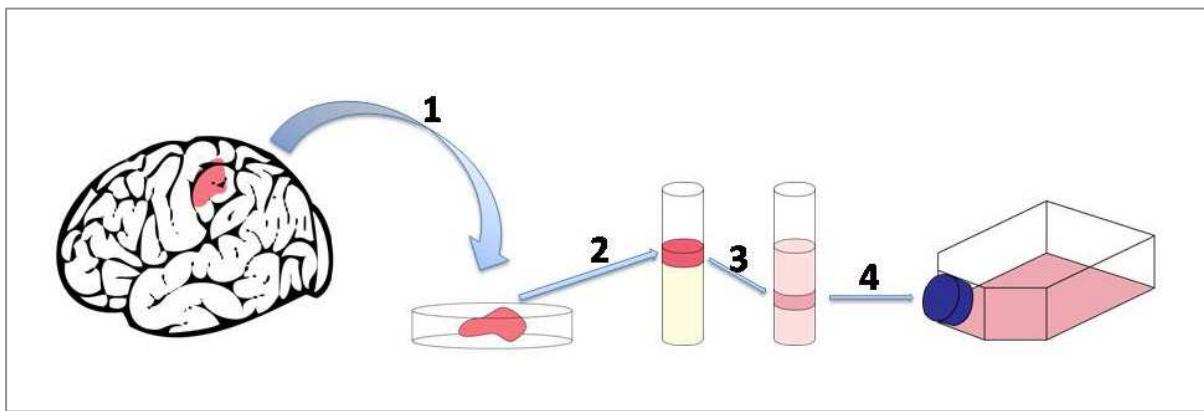


Abb.3: Isolation von hMSC aus Tumorresektat:

- 1: Das Glioblastomgewebe wird reseziert und in einer Petri-Schale aufgearbeitet
- 2: Die Zellsuspension wird in einem Falcon auf die Histopaque-Lösung geschichtet
- 3: Nach Zentrifugation befinden sich die hMSC in einer Schicht bei 12,5 – 22,5ml
- 4: Die hMSC werden abpipettiert und in einer Zellkulturflasche inkubiert

6.1.8 In vitro Färbemethoden

6.1.8.1 Calcein AM Zytoplasmafärbung

Calcein AM (Invitrogen) ist der bis-Acetoxyethyl-Ester (AM) von Calcein, einem Fluorescein-Derivat. Calcein AM wird durch die Membran lebender Zellen in das Zytoplasma geschleust und dort von unspezifischen Esterasen zu Calcein gespalten, das nun in der Lage ist, Kalzium-Ionen zu binden, was in einer grünen Fluoreszenz (Extinktion: 515nm) resultiert.

Calcein wird in der Biochemie zur Messung der Lebensfähigkeit von Zellen und aufgrund seiner geringen Größe (622 Dalton) zur Detektion von Kommunikation via gap junctions genutzt¹²⁸.

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden die zu färbenden Zellen aus der Zellkulturflasche nach unter „Kultivieren von Zellen“ sowie „Bestimmung der Zellzahl“ beschriebenen Verfahren gelöst, zentrifugiert und gezählt. Maximal eine Millionen der Zellen wurden in ein 15ml Falcon in ihrem zellspezifischen, vorgewärmten Medium suspendiert. Diesem wurde nun Calcein AM (gelöst in DMSO) hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 5µM Calcein zu erreichen. Die Zellen wurden anschließend 30 Minuten unter mehrmaligem Durchmischen im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension bei Raumtemperatur und 1500 U/min 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 10ml vorge-

wärmten PBS aufgenommen und schonend durchmischt. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt, um noch außerhalb der Zellen verbliebenes Calcein AM zu eliminieren. Nach Resuspension in Medium waren die gefärbten Zellen nun zum weiteren Gebrauch nutzbar.

6.1.8.2 Lipophilic Tracer Membranfärbung

Lipophilic Tracers sind Farbstoffe aus Dialkylcarbocyaninen und ihren Derivaten, die von Zellen aufgenommen werden und sich in die lipophile Zellmembran einbauen⁶⁵. Aufgrund ihrer Größe können sie nicht mehr über Kanäle der gap junctions ausgetauscht werden. Deswegen kann ihre Aufnahme von einer anderen Zelle nur durch ein Austausch von Membranbestandteilen oder Fusion erklärt werden. Hier wurden das rotfluoreszierende Dil (Extinktion: 565nm, Invitrogen) und das grünfluoreszierende DiO (Extinktion: 501nm, Invitrogen) genutzt.

Um eine möglichst deutliche und langanhaltende Färbung zu erreichen, wurden die Farbstoffe über Nacht in das Medium der Zellen gegeben. Hierzu wurde den angewachsenen Zellen das Medium entnommen, es folgte ein Waschschritt mit gleicher Menge PBS und das mit dem Farbstoff versetzte Medium wurde auf die Zellen pipettiert. Die Endkonzentration betrug für Dil 4µg/ml, für DiO 3µg/ml.

Die Farbintensität wurde am nächsten Tag überprüft. Daraufhin wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit gleicher Menge PBS gewaschen, um eventuell nicht aufgenommenen Farbstoff zu eliminieren. Anschließend konnten die angewachsenen Zellen mit Medium bedeckt werden oder mit Trypsin/EDTA-Lösung mobilisiert werden.

6.1.8.3 Dextran-Tetramethylrhodamine Zytoplasmafärbung

Diese Zelfärbemethode dient dazu, das Zytoplasma einer Zelle sichtbar zu machen. Hier erfolgt dies mit Dextran, an das ein rot fluoreszierendes Tetramethylrhodamine (Extinktion: 570-590nm, Invitrogen) gekoppelt ist und zusammen ein Molekulargewicht von 10 000 MW hat. Aufgrund des relativ hohen Gewichts ist es den Zellen nicht möglich, das Dextran aufzu-

nehmen, aber – einmal in der Zelle – auch nicht mehr abzugeben. Um die Farbmoleküle dennoch in die Zellen zu transferieren, wurde ein abgewandeltes Protokoll nach McNeil verwendet⁸⁰.

Den in einer 75cm² großen Zellkulturflasche angewachsenen Zellen (Zellzahl: ca 100 000) wurde das Medium entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 1ml serumfreien Mediums, in dem zuvor das Dextran-Tetramethylrhodamine in einer Konzentration von 2mg/ml gelöst wurde. Unmittelbar im Anschluss wurde ein Zellschaber benutzt, um zeitgleich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen und das Dextran in die Zellen einzureiben. Die Suspension wurde in 10ml eines in Eis vorgekühlten Mediums aufgenommen. Die Zellen waren maximal 15 Sekunden der Farbstoffkonzentration expo-niert. Anschließend wurde die Suspension zweimal bei 4°C und 1200 U/min 5 Minuten zentrifugiert und war dann zur weiteren Verwendung bereit.

6.1.8.4 Quantum Dots Zytoplasmafärbung

Quantum Dots (Invitrogen), oder auch QTracker genannt, sind 15 - 20 nm im Durchmesser große Nanokristalle, die einen Kern aus einer Kadmium-Selen-Mischung haben, der mit einem Zinksulfid-Mantel ausgestattet ist. Die Größe der Dots bestimmt die Emission und damit die Farbe der Fluoreszenz⁴⁶. Aufgrund der soeben beschriebenen Größe können sie - wie die zum Beispiel die Lipophilic auch – nicht via gap junctions übertragen werden und dienen als weiterer Nachweis eines Austauschs mittels partieller oder kompletter Fusion.

Hier wurden das rot fluoreszierende Labeling Kit Qdot 655 (Emission: 655nm) und das grün fluoreszierende Labeling Kit Qdot 525 (Emission: 525nm) verwendet.

Das Herstellerprotokoll wurde folgendermaßen modifiziert: Die anzufärbenden Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und gezählt. Im Anschluss wurden sie je nach Zellgröße in Anzahl von 50.000 bis 100.000 Stück in einer 6well-Kulturschale in 2ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Nachdem die Zellen 2 Stunden angewachsen waren, wurden die Quantum Dots vorbereitet: pro well wurde folgende Menge Nanokristalle verwendet: in

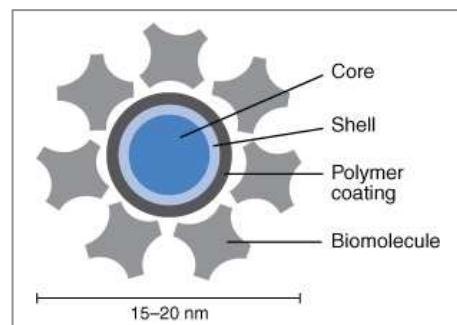


Abb.4: Struktur eines Nanokristalls
©Invitrogen.com

ein 1,5ml-Eppendorf-Cup wurden 2 μ l der Komponente A (Lösung mit den Kristallen) und 2 μ l der Komponente B (Lösung mit Ketten aus 9 Argininmolekülen) pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Argininkette dient der Aufnahme der Nanokristalle in das Zytoplasma durch Pinozytose und wird bei diesem Schritt mit den Dots verbunden. Anschließend wurden 200 μ l Medium hinzugefügt und 30 Sekunden mit Zellsuspensionsrotator durchmischt. Die Lösung wurde in das Zellmedium pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst, um, mit Quantum Dots beladen, in Experimenten genutzt zu werden.

6.1.8.5 Organelle Lights Transfizierung

Organelle Lights (Invitrogen) ist eine Transfizierungs-Methode bei der mit Hilfe eines Baculovirus eine DNA-Sequenz in das Erbgut der Zielzelle eingeschleust wird und dazu dient, dass in der jeweiligen Zielstruktur wie zum Beispiel in Mitochondrien oder in dem endoplasmatischen Retikulum ein fluoreszierendes Protein co-exprimiert wird⁷³.

Hier wurden das die Mitochondrien grün fluoreszierend lassende Organelle Lights Mito-GFP (Extinktion: 525nm) und das die Zellmembran rot fluoreszierend lassende Organelle Lights PM-OFP (Extinktion: 585nm) verwendet.

Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren: Die Zellen wurden einen Tag vorher in einer 75cm² Zellkulturflasche ausgesät. Vor Gebrauch der Reagenzien wurde das Me-

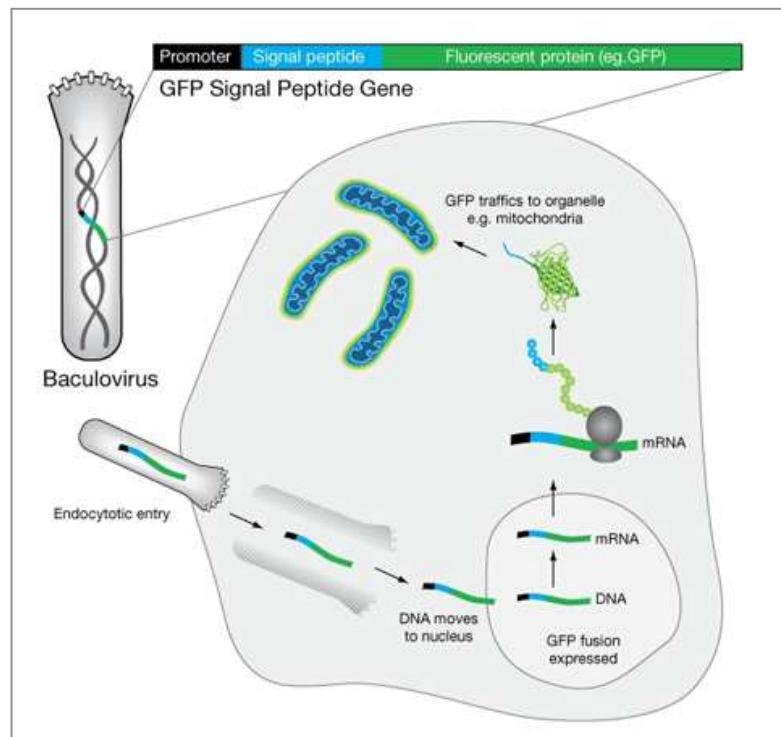


Abb.5: Transfektion mittels Baculovirus ©Invitrogen.com

dium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und nun die erste Komponente A des Organelle

Lights Kit, das den Baculovirus enthält, im Verhältnis 2:3,5 mit 3,5ml D-PBS vermischt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden 3 Stunden lang bei 25°C auf einem Rotatortisch in dunkler Umgebung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und durch 10ml Medium sowie 10µl der Komponente B, dem Enhancer, gelöst in DMSO, ersetzt und 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In Folge wurde das Medium durch frisches ausgetauscht und die Zellen mindestens 16 Stunden stehen gelassen, um genügend Zeit zur Produktion des fluoreszierenden Proteins zu lassen.

6.1.8.6 Fixierung und DAPI Kernfärbung

Nachdem die Zellen angefärbt wurden und die jeweiligen Experimente durchgeführt waren, diente die Fixierung und Färbung mit DAPI (Sigma) der Sichtbarmachung der Zellkerne. Hierzu wurde das Zellmedium entnommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4%em Paraformaldehyd (Sigma) 15 Minuten bei 4°C fixiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS.

4',6-Diamidino-2-phenylindol, kurz DAPI, ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff (Extinktion: 358nm), der zum Anfärben der DNA dient¹¹⁸. Mit einer Konzentration von 2µg/ml (in DMSO gelöst) wurden die Zellen mit diesem 6 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach Spülung mit PBS konnte das Ergebnis unter dem Mikroskop dokumentiert werden.

6.1.9 Mikroskopie

Zur Kontrolle des Zellzustands und zur Dokumentation der Versuchsergebnisse wurden unterschiedliche Mikroskopiergeräte und –techniken benutzt. Verwendung fanden Geräte der Firma Zeiss und Hund sowie ein Inkubationssystem mit inverser Mikroskopie³⁹.

6.1.9.1 Durchlichtmikroskopie

Hier wird das Licht durch das Objekt geleitet, bevor es das Objektiv durchläuft. Kontrast – und damit sichtbare Begrenzung – wird entweder durch die Absorption der Lichtstrahlen durch das Objekt selbst oder durch Schließung der Aperturblende erzeugt, wobei bei letzterer mit gewollter Reduktion der Hintergrundintensität ein Verlust der Auflösung einhergeht. Diese Methode diente der Kontrolle des Zellzustands.

6.1.9.2 Phasenkontrastmikroskopie

Der Phasenkontrast dient der Darstellung von kontrastarmen Strukturen, wie von Zellabbildungen in hohen Mikroskopvergrößerungen. Bei dieser Methode wird die für das menschliche Auge unsichtbare Phasenverschiebung in wahrnehmbare Helligkeitsunterschiede umgewandelt. Dieser Effekt kommt durch die Interferenz zwischen dem durch das Objekt gebeugten Licht und direktem Mikroskopierlicht zustande.

6.1.9.3 DIC-Mikroskopie

DIC bedeutet differentieller Interferenzkontrast. Hierbei wird, ähnlich dem Phasenkontrast, zwei senkrecht zueinander stehende Lichtwellenzüge durch das Objekt geleitet, um Dichte- oder Strukturunterschiede in kontrastarmen Objekten sichtbar zu machen. Anders als beim Phasenkontrast kann der Kontrast hier aber stufenlos verstellt werden und damit die Intensität des Hintergrundes variiert werden.

6.1.9.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wird von folgendem Prinzip geleitet: sich im Objekt befindliche fluoreszierende Stoffe werden durch Licht bestimmter Wellenlänge zum Leuchten angeregt und damit sichtbar gemacht. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampflampe, die das

gesamte sichtbare Lichtspektrum sowie den ultravioletten Bereich emittiert. Optische Filter isolieren ein schmalbandiges, zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs dienendes Licht bevor es auf das Objekt trifft. Dieses beginnt zu fluoreszieren. Das nun emittierte Licht wird vom Objektiv gesammelt und ein Farbteiler trennt dieses vom anregenden Licht und leitet es ins Okular weiter.

6.1.9.5 Kombinationsmöglichkeiten

Mit dem eingangs erwähnten Inkubatormikroskop wurden zwei Dingen erreicht: Zum einen war, durch die auf dem Objekttisch angebrachte Inkubationskammer, in der die optimale Wachstumsumgebung von 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit eingestellt werden konnte, die Möglichkeit gegeben, Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Zum anderen konnte hier die Fluoreszenz- mit der DIC- oder Phasenkontrastmikroskopie kombiniert werden, um strukturelle Eigenschaften und die genaue Verteilung des Farbstoffes innerhalb der Zellen zu dokumentieren. Verstärkt werden konnte dieser Effekt durch die Verwendung von Inkubationskammern mit Borosilikatglasboden (Nunc).

6.1.10 Tube Formation Assay

Ein Tube Formation Assay diente als Modell der Angiogenese¹²³. Die zu untersuchenden Zellen werden auf einem Matrigel ausgesät, einem Proteingemisch, das extrazelluläre Matrixbestandteile wie Laminin, Kollagen IV, Proteoglykane und Entaktine enthält, um eine mögliche Differenzierung und Röhrenbildung der Zellen zu beobachten.

6.1.10.1 Durchführung

Das Matrigel (BD Biosciences) wurde schonend auf Eis aufgetaut und anschließend je 50µl in ein well einer 96well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Diese wurde eine Stunde zum Aushärten in den Inkubator gestellt.

Die zu untersuchenden und entsprechend vorbereiteten Zellen wurden ausgezählt und in Zellzahlen von 5 000 bis 30 000 in 100 μ l Medium aufgenommen und auf das Matrikel gegeben. Anschließend wurde das Wachstum im zeitlichen Verlauf dokumentiert.

Als neuer Ansatz wurde hier ein Tube Formation Assay mit zwei verschiedenen Zellarten etabliert. Die Zellarten wurden am Vortag wie oben beschrieben jeweils mit unterschiedlichen Lipophilic Tracers (Dil und DiO) beladen und in verschiedenen Kombinationen auf die Matrix gebracht, um die Interaktion der Zellen zu beobachten.

6.1.10.2 Quantifizierung

Um das Ergebnis quantifizieren zu können, wurde folgendes, etabliertes Verfahren²⁶ angewandt: Es wurde das Ausmaß der Tube-Bildung in Prozent im Verhältnis zur Gesamtzellzahl zu bestimmten Zeitpunkten erfasst.

6.1.11 Ko-Kultur

Um mögliche Zellinteraktionen zwischen zwei verschiedenen Zelltypen nachweisen zu können, wurden diese mit unterschiedlichen, oben bereits erwähnten Fluoreszenzstoffen beladen und zusammen kultiviert. Als Zellzahl wurde eine Dichte von 9 000 – 10 000 Zellen pro 0,32cm² (ein well einer Mikrotiterplatte) angestrebt.

6.1.11.1 Durchführung mit verschiedenen Färbetechniken

War das Prinzip der Ko-Kultur bei allen Experimenten gleich, gab es zwischen den einzelnen Farbstoffen doch Unterschiede:

Bei den Calcein-Versuchen wurde eine der Zellarten mit dem Membranfarbstoff Dil am Vortag markiert und bereits in bestimmter Zellzahl in ein well einer Mikrotiterplatte in 150 μ l des entsprechenden Mediums ausgesät. Am folgenden Tag wurden diese Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit neuem Medium ausgestattet. Die mit Calcein AM beladenen, in Sus-

pension befindlichen Zellen wurden nun ebenfalls in abgezählter Form in 50 μ l Medium in das well pipettiert, anschließend im Brutschrank über einen Zeitraum von mindestens vier Stunden inkubiert und regelmäßig beobachtet. Diese geringe Zeitspanne reichte aus, um den möglichen Transfer niedrig molekularer Stoffe über gap junctions zu dokumentieren, wobei der verstrichene Zeitraum für das Anheften der Zellen, die Migration und das Zustandekommen der Zell-Zell-Kontakte benötigt wird und nicht für den Transfer selbst.

Die Versuche mit höher molekularen Farbstoffen – die auf ein mögliches Fusionsgeschehen zwischen den Zellen abzielten - wie Lipophilic Tracer, Quantum Dots, Rhodamine oder Organelle Lights unterschieden sich in folgendem Punkt: Hier wurden beide Zelltypen nach Färbung nochmals gelöst und in Suspension gebracht. Das heißt, sie wurden gemischt und zeitgleich in 200 μ l Medium in ein well der Mikrotiterplatte gebracht. Auch der Beobachtungszeitraum dehnte sich auf 48h Stunden aus.

6.1.11.2 Quantifizierung

Die Calcein-Experimente wurden folgendermaßen quantifiziert: eine mit Calcein beladene Zelle wurde randomisiert in den Fokus des Gesichtfeldes im Mikroskop manövriert und die Zahl der sowohl mit Calcein als auch mit Dil beladenen Zellen im direkten Umfeld notiert. Um an eine statistische Aussage zu gelangen, wurde dies bei mindestens 30 ebenso zufällig ausgewählter Gesichtsfeldern wiederholt.

Bei den anderen Farbstoffen verlief die Quantifizierung ähnlich: Hier wurden die Zellen, die zu dem entsprechenden Beobachtungszeitpunkt mit beiden Fluoreszenzstoffe markiert waren pro randomisiertem Gesichtsfeld gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl im Gesichtsfeld gesetzt. Auch hier wurden mindestens 30 Gesichtsfelder ausgezählt.²²

6.1.12 Sphäroidkultur

Als Sphäroid wird eine kugeliges Konglomerat aus Tumorzellen bezeichnet, die eine standardisierte Versuchsgröße erlaubt und durch ihre Struktur in Fragen des Metabolismus, der ex-

primierten Proteine und anderer Botenstoffe näher am *in situ* Modell eines Glioms ist als die Monokultur⁵¹.

6.1.12.1 Anlegen von Sphäroiden

Um aus einer Einzelzellsuspension einen Sphäroid bilden zu können, musste den Zellen die Möglichkeit genommen werden, sich an einer Oberfläche anhaften zu können und somit ihnen als einzigen Halt die Nachbarzelle anzubieten. Dies geschah auf folgende Arten:

6.1.12.1.1 Sphäroide auf Agar-beschichteten Böden

Agar (Sigma) ist ein Galaktose-Polymer, dessen Oberflächenstruktur die Zellen am Anwachsen hindert. Deswegen wurde eine Mischung aus Agar und DMEM (Konzentration: 10mg/1ml) angerührt und in der Mikrowelle mehrmals zum Aufkochen gebracht, um das Agar vollständig zu lösen. Anschließend wurde die Lösung sofort mit je 50µl pro well in eine 96well-Mikrotiterplatte pipettiert und eine Stunde im Inkubator zum Aushärten gebracht. Die zu verwendenden Zellen wurden wie oben beschrieben in eine Einzelzellsuspension gebracht und ausgezählt. Pro well wurden 3 000 Zellen in 100µl Medium ausgesät. Diese wurden nun zwei Tage inkubiert.

6.1.12.1.2 Sphäroide im hängenden Tropfen

Auch hier wurden die Zellen in Suspension gebracht und ausgezählt. Die angestrebten 3 000 Zellen wurden in 30µl Medium aufgenommen und auf den umgedrehten Deckel einer Petrischale in Tropfenform pipettiert. Das Bodenteil der Schale wurde mit 5ml Medium gefüllt, um durch ein Flüssigkeitsreservoir ein Austrocknen der Tropfen im Inkubator zu verhindern. 8 -10 Tropfen wurden aufpipettiert und anschließend der Deckel in einer flüssigen Bewegung umgedreht und auf den befüllten Boden gebracht. Nun sammelten sich die Zellen der

Schwerkraft folgend in der Spitze des hängenden Tropfens und wurden ebenfalls zwei Tage bei 37°C inkubiert.

6.1.12.2 Calcein-Stammzellspähroid auf Tumorzellrasen

Hier wurden pro well 15 000 Tumorzellen in 200µl Medium in je ein well einer Mikrotiterplatte ausgesät, diese über Nacht mit Dil angefärbt und am folgenden Tag das Medium abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und mit frischen Medium versehen. Die über zwei Tage in einem Tropfen angewachsenen Sphäroide aus Stammzellen wurden unter einem Mikroskop, das unter der Laminar Air Flow Werkbank steril platziert wurde, beurteilt und anschließend wurde Calcein AM in das Medium des Tropfens hinzugefügt, bis eine Konzentration von 5nM erreicht war. Nach einer halben Stunde Inkubation im Brutschrank wurde der Sphäroid mit Hilfe einer Pipette und einem Zugvolumen von 5µl aus dem Tropfen gepickt und zweimal in 100µl PBS gewaschen. In Folge wurde je ein Sphäroid in ein well auf den Tumorzellrasen pipettiert und über 5 Stunden beobachtet.

6.1.12.3 Migrationsassay mit Sphäroiden

Die bereits von Goldbrunner et al. etablierte Methode⁵² beschreibt das Auswachsen von Sphäroiden unter extrazellulären Matrix-ähnlichen Bedingungen und wurde hier auf aus Tumor- und Stammzellen bestehende sowie gemischte Sphäroiden übertragen.

6.1.12.3.1 Durchführung

Sphäroide wurden sowohl aus ausschließlich Tumorzellen, aus ausschließlich Stammzellen sowie aus gemischten Tumorzell-Stammzellsuspensionen gebildet. Die Zellzahl pro Sphäroid betrug 3 000, bei gemischten Sphäroiden war sie gleichermaßen aufgeteilt.

Im Vorfeld wurden wells von Mikrotiterplatten entweder mit Laminin (Sigma) oder mit Fibronektin (Sigma) beschichtet: Die Reagenzien wurden in D-PBS (Cambrex) gelöst, um eine

Konzentration von $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu erreichen und anschließend mit $30\mu\text{l}$ pro well für eine Stunde im Inkubator zum Aushärten gebracht. Diese beiden Proteine sind Bestandteile sowohl der physiologischen als auch der im Tumorgewebe vorkommenden extrazellulären Matrix^{68;136}.

Pro Kombination wurden fünf Sphäroide in die Auswertung mit einbezogen.

Vor Aussähen der Sphäroide wurden die wells einmalig mit PBS gewaschen. Die Sphäroide wurden nach zwei Tagen aus ihrem Tropfen pipettiert und in je ein well einer 96well-Mikrotiterplatte in $150\mu\text{l}$ Medium ausgesät. Randständige Sphäroide wurden mit einer Pipettenspitze nachträglich in die Mitte des wells positioniert. Dieser Zeitpunkt diente als Stunde 0. Es folgte eine Dokumentation über die folgenden 72 Stunden.

6.1.12.3.2 Quantifizierung

Nachdem die Migration via Mikroskop und Digitalkamera mit den immer konstanten Parametern (5x Vergrößerung des Objektivs und 4,3x Zoom der Kamera) festgehalten worden war, wurde die Fläche auf der sich die Zellen ausgebreitet hatten mit Hilfe der Software wegaviewer (M.O.S.S.) berechnet.

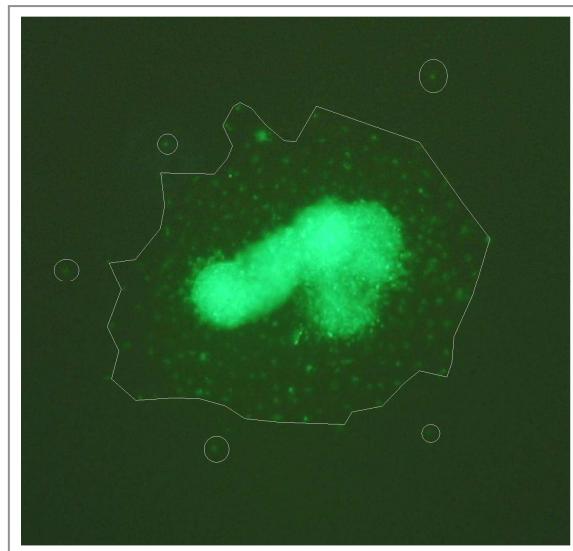


Abb.6: Bestimmung der Migrationsfläche mit fünf nicht mit einbezogenen „Ausreißer“-Zellen

6.1.13 Blockierung der gap junction Kommunikation durch Glycyrrhetininsäure (AGA)

Glycyrrhetininsäure (= 18α -Glycyrrhetic acid, AGA, Sigma) ist ein etablierter Inhibitor der Kommunikation via gap junctions²⁷.

Es wurden Calcein-Experimente wie bereits oben beschrieben vorbereitet. AGA wurde in DMSO nach Herstellerinformationen gelöst. Anschließend wurde die jeweilige angestrebte Konzentration an AGA in dem den Zellen entsprechenden Medium hergestellt. Nun wurden die mit Calcein beladenen Zellen in diesem Medium suspendiert und in errechneter Zahl auf die angewachsenen Dil-gefärbten Zellen gegeben.

AGA konnte nach zwei Stunden durch Entfernen des Mediums, einem Waschschritt mit PBS sowie Auffüllen mit frischem Medium aus dem Versuch eliminiert werden. Eine Dokumentation erfolgte über vier Stunden.

6.1.14 Immunzytochemie

Immunzytochemie dient dem Nachweis spezifischer Antigene von Zellen.

Hierzu wurden die Zellen ein bis zwei Tage vor dem Experiment mit einer Zellzahl von 8 000 Zellen in 0,32cm²-Mikrotiterschalen in geeignetem Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu Beginn der Immunzytochemie wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Antigenort fixiert: Für membranständige Antigene erfolgte eine Fixierung mit 4%em Paraformaldehyd für 20 Minuten bei 4°C. Optional kann nach einmaligem Waschen mit PBS anschließend die Membran mit 1%em TritonX-100 permeabilisiert werden. Die Inkubationszeit hierbei betrug 5 Minuten bei 4°C. Für zytoplasma- oder kernständige Antigene wurden die Zellen mit auf -20°C vorgekühltem Methanol bei -20°C für 5 Minuten fixiert. Nun wurden die Zellen für 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Als nächster Schritt erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit einer 1%en in PBS gelösten BSA-Konzentration für dreimal 10 Minuten.

Der primäre, gegen das Antigen gerichtete Antikörper wurde je nach Herstellerinformationen in der maximal empfohlenen Konzentration in Antibody Diluent (Dako) verdünnt, auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde je ein Zelfeld mit reinem Antibody Diluent versehen.

Am zweiten Tag der Immunzytochemie erfolgte ein nochmaliger Waschschritt mit 1%em BSA für dreimal 10 Minuten. Ab diesem Zeitpunkt wurde zum Schutz der fluoreszierenden Reagenzien die Inkubationsperiode im dunklen Zustand organisiert.

Der sekundäre Antikörper richtet sich nach den Antigeneigenschaften des primären Antikörpers, das heißt, er reagiert mit den spezies-typischen Antigenen des primären Antikörpers, je nachdem aus welchem Tier er gewonnen wurde. Hier wurden sowohl der grün fluoreszierende FITC-Antikörper (Extinktion: 503nm, Sigma-Aldrich) als auch der rot fluoreszierende TexasRed-Antikörper (Extinktion: 595nm, Linaris) genutzt. Auch diese Antikörper wurden in

der vom Hersteller empfohlenen maximalen Konzentration in Antibody Diluent verdünnt und auf den Zellen 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es schloss sich ein dreimaliger Waschschritt mit 1%em BSA an. Im Folgenden wurden die fixierten Zellen nun 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI-Lösung (2 μ g/ml in DMSO gelöst, Sigma) inkubiert, um die Zellkerne gegenzufärben. Dieser Schritt dient dem Nachweis von Zellen bei negativem Ergebnis der Antikörperfärbung. Es folgte ein nochmaliger Waschvorgang mit 1%em BSA für dreimal 10 Minuten.

Anschließend wurde das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

6.1.15 Western Blot

Auch die Methode des Western Blots dient dem Nachweis spezifischer Proteinstrukturen von Zellen. Im Folgenden werden die dafür nötigen Schritte Proteinisolation, -bestimmung sowie der Chemilumineszenz dargestellt.

6.1.15.1 Verwendete Lösungen

Lysepuffer Protease Inhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma), 10 mM Tris, 0.5 % NP-40, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 8.0

Elektrophoresepuffer (TBS) 25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3

Transferpuffer 48 mM Tris, 39 mM Glycine, 0.01 % SDS, 20 % Methanol, pH 8.3

Waschpuffer (TTBS) 20 mM Tris, 136 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 6,8

Blockierungs-/Inkubationslösung 20 mM Tris, 136 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 6,8, 5% non-fat milk

Lämmli puffer 4X	4×fach TrisCl (pH 6.8) 5 ml, SDS 0.8 g, 100% Glycerol 4 ml, Bromophenol Blue, 0,5ml H ₂ O, Frisch hinzugeben: 5% β-Mercaptoethanol
Coomassie Färbelösung	5ml Essigsäure, 50ml Methanol, 45ml H ₂ O, 0,5g Coomassie blue G-250
Coomassie Entfärbelösung	5ml Essigsäure, 50ml Methanol, 45ml H ₂ O
Ponceau S Lösung	0,5g Ponceau S, 1ml Eisessigsäure, 98,5 ml H ₂ O

6.1.15.2 Proteinisolierung

Die verwendeten Zellen wurden in einer 75cm² Kulturflasche konfluent inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit eiskühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5ml vorgekühlter Lysepuffer auf die Zellen pipettiert und nach einer halben Minute Inkubationszeit ein Lysat mit Hilfe eines Zellschabers hergestellt. Dieses wurde aufgenommen und in einem 1,5ml-Eppendorf-Cup mittels einer 1ml Spritze (26G-Spitze) mehrmals durchmischt, um Membranstrukturen zu zerstören. Die Suspension wurde nun 10 Minuten bei 12 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und bei -20°C gelagert.

6.1.15.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode dient der Bestimmung des Proteingehalts des gewonnenen Lysats. Mit Hilfe eines Bradford Dye Reagenz/ BSA Standard Kits (Bio Rad) wird die Konzentration der Proteine in Lösung mit einer Eichkurve verglichen und daraus der Gehalt errechnet. Die Messungen erfolgten in einem Biophotometer (eppendorf) mittels Extinktionsbestimmung.

6.1.15.4 Chemilumineszenz

Es wurden pro Zelllysat 15µg verwendet, dieses mit Lämmlipuffer (mit frisch versetztem β-Mercaptoethanol) im Verhältnis 4:1 gemischt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Während dessen wurde das Elektrophorese-Gel (10-20 % Poliacrylamide Ready Gels, Bio-Rad) vorbereitet und im Mini-Protean 3 cell apparatus (Bio-Rad) befestigt. Die Wanne wurde mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer befüllt. Die Lysate wurden nun mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) in die Taschen des Gels gefüllt und je eine Tasche mit einer Kombination aus den Markern SeeBlue (Invitrogen) und MagicMarker (Invitrogen) und der für den jeweiligen Antikörper gewählten Positivkontrolle befüllt. Die Elektrophorese bei 110V lief 60 Minuten.

Zur Vorbereitung des Transfers der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran (Bio Rad) wurde diese für einige Sekunden in Methanol inkubiert und anschließend wie die Fiber pads und das Blotpapier 15 Minuten in Transferpuffer vorbereitet.

Das Gel wurde entnommen und 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Daraufhin wurden die Materialien in folgender Reihenfolge in die Kassette der Blotkammer sortiert: Fiberpad – Blotpapier – Gel – Membran – Blotpapier – Fiberpad. Die Blotwanne wurde mit vorgekühltem Transferpuffer befüllt und mit Eis umgeben. Die Transferdauer betrug bei 110V 90 Minuten.

Im Anschluss konnte der Erfolg des Transfers mit Hilfe der Coomassie-Lösung am Gel und mit Hilfe der Ponceau-S-Lösung an der Membran überprüft werden.

Die nun folgenden Bearbeitungsschritte geschahen alle unter sanfter Bewegung der Membran auf einem Rotator. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mittels TTBS mit 5% non fat milk (Carl Roth) für 60 Minuten. Die Membran wurde nun über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, gelöst in Inkubationslösung im Verhältnis 1:200) inkubiert.

Nach dreimal fünf minütigen Waschschrift mit TTBS folgte die Inkubation mit dem an Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper (Sigma Aldrich), in Inkubationslösung im Verhältnis 1:10 000 gelöst, für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein dreimaliger Waschschrift an.

Die Membran wurde nun mit 3ml einer Lösung aus Immunstar Luminol Enhancer und HRP Peroxid-Puffer (Bio Rad) 5 Minuten inkubiert. Die Peroxidase des sekundären Antikörpers

bindet das Luminol und setzt es in eine Fluoreszenz um. Die Membran wurde durch Einschweißen in eine Folie und kräftiges Auswälzen von überschüssiger Lösung befreit und zugleich in feuchtem Zustand gehalten. Mit Hilfe einer Entwicklungsmaschine Scopix LR 5200 (Agfa) und Röntgenfilm Super X-Ray RX (Fuji) wurde das Ergebnis anschließend dokumentiert.

Zur Kontrolle der Resultate wurde die Membran gestript: einem Waschschritt mit H₂O folgte eine Inkubation mit NaOH über 5 Minuten bei Raumtemperatur mit wiederholtem Waschen mit H₂O. Der an Peroxidase konjugierte Antikörper gegen β-Aktin (Santa Cruz) wurde in Inkubationslösung im Verhältnis 1:20 000 für 1 Stunde belassen, bevor nochmalig ein Waschvorgang mit TTBS und die Schritte zur Dokumentation folgten.

6.1.16 Immunzytochemie einer Co-Kultur

Diese Versuche waren eine Kombination aus der zuvor beschriebenen Co-Kultur aus zwei verschiedenen Zelltypen und einer darauf folgenden Immunzytochemie. Gliomzellen des Typs U373 GFP sowie Stammzellen der Variante L87 wurden mit einer Anzahl von je 2000 Zellen pro 0,32cm² in 200µl Medium (DMEM versetzt mit 10% FCS und Antibiotika) suspenziert und für 5 Tage inkubiert. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Ablauf des Zeitraums wurden die Zellen mit PFA 4% fixiert und einer Immunzytochemie mit dem Antikörper SV40 T-Antigen (Calbiochem) unterzogen. Das Experiment diente dazu, eine komplettte Fusion der beiden Zelltypen nachzuweisen, da die SV40-Gensequenz der Stammzellen im Nukleus derselben lokalisiert ist und nach Fusion ebenfalls in den mittels GFP markierten Tumorzellen zu finden sein könnte.

6.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die hier durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen fanden mit Zustimmung der Regierung von Oberbayern unter Beachtung der gültigen Tierschutzgesetze statt. Sie werden ergänzend angeführt, dienten als Vorversuche für eine Serie von tierexperimentellen Fragestellungen, die Bestandteil weiterer Arbeiten des Tumorbiologischen Labors geworden sind.

Die von der Firma Harlan bezogenen Nacktratten des Stamms HSD:*rh*-rnu waren ausschließlich männlich und bei Lieferung 8-9 Wochen alt sowie 200-300g schwer. Die Tiere zeichneten sich durch eine Immuninkompetenz aus, die auf einem autosomal-rezessiven Gendefekt beruht und ihnen einen zystischen und nicht funktionalen Thymus beschert^{40;41;72}. Diese Inkompetenz eignet die Ratten für Transplantationen mit xenogenem Material und macht eine Abstoßungsreaktion äußerst unwahrscheinlich.

Die Tiere wurden in einem Inkubatorschrank mit regelmäßigem Tageslichtrhythmus gehalten und mit sterilem Einstreu und Nahrung versorgt.

Ziel dieses Tierversuchs war es, die Wirksamkeit der L87-Tie2-Tk-Stammzellen in vivo zu beweisen und damit teilweise die bereits durchgeführten Experimente mit den L87-Tie2-RFP-Zellen zu bestätigen. Diese wurden nach lokaler sowie nach systemischer Gabe an Versuchstieren mit einem zuvor injizierten Gliom im Tumorphänotyp und –endothel nachgewiesen. Der Mechanismus dieser transplantierten Zellen wurde bereits erläutert: Nach Einbau in das Gefäßnetz des Tumors und damit einer Differenzierung in einen mehr endothelialen Typ, exprimieren die Stammzellen eine Thymidinkinase, die das applizierte Ganciclovir umsetzt. Hierzu wurden den Tieren zu Beginn je 1 Millionen U87-Tumorzellen intrakraniell implantiert. Es folgte eine MRT-Kontrolle 2-3 Wochen im weiteren Verlauf, um sicher zustellen, dass sich ein Tumor gebildet hatte und um dessen exakte Ausmaße zu bestimmen. Daraufhin wurden den Versuchstieren die ersten Stammzellen des Typs L87-Tie2-Tk i.v. (intravenös) injiziert. Um die Migration in das Gefäßsystem und Differenzierung dieser Zellen abzuwarten, erfolgte die Ganciclovirgabe i.p. (intraperitoneal) am zweiten sowie am dritten Tag nach Stammzellgabe. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt, inklusive einer erneuten MRT-Kontrolle im Zuge des vierten Ablaufs, um die Wirksamkeit der Therapie bereits am lebenden Tier durch eine mögliche Tumorregression zu dokumentieren. Beendet wurde die Versuchsreihe zum Teil durch den frühzeitigen Tod der Ratten oder durch das Töten der letzten Versuchstiere zwei Wochen nach dem letzten Therapiezyklus.

6.2.1 Orthotope Tumorimplantation intrakraniell

Die zu implantierenden humanen Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen angezüchtet, am Tag der Operation wie im zellbiologischen Abschnitt weiter oben beschrieben gelöst, gezählt und anschließend in PBS aufgenommen und unter sterilen Bedingungen auf Eis transportiert. Nach etablierter Methode⁵¹ lief die Operation ab: Das Operationsumfeld wurde mit Ethanol gereinigt. Die Tiere wurden mit Hilfe eines Vapor-Narkosemittelverdampfer (Dräger) (O_2 : 2 L/min; N_2O : 0,7 L/min; Isofluran (Abbott): 2-4 Vol% je nach Narkosetiefe) narkotisiert und in eine Kopfhalterung des stereotaktischen Operationstisches (Kopf Instruments) eingespannt. Während der OP wurde die Narkose aufrecht erhalten und die Vitalparameter der Tiere regelmäßig überprüft. Der Schädel wurde rasiert und gereinigt. Es wurde ein Hautschnitt entlang der Schädelmitte zwischen den Augen bis zu der Kopfhinterkante gesetzt und das Periost freipräpariert. In der Mitte zwischen Bregma- und Lambdalinie wurde auf der rechten Schädelhälfte ein Loch durch die Schädelplatte gebohrt, die Dura blieb intakt. Mit Hilfe einer fixierten Mikroliterspritze (Hamilton) wurden nun 1 Millionen U87-Tumorzellen in 5 μ l PBS gelöst 2mm unter die Kortexoberfläche injiziert. Der Knochendefekt wurde mit Knochenwachs (Ethicon) geschlossen und die Hautwunde mit Supolene-Faden (Ethicon) vernäht. Die kurzzeitige Überwachung der Tiere nach Beendigung der Narkose diente dem Ausschluss eventuell auftretender Operationsfolgen.

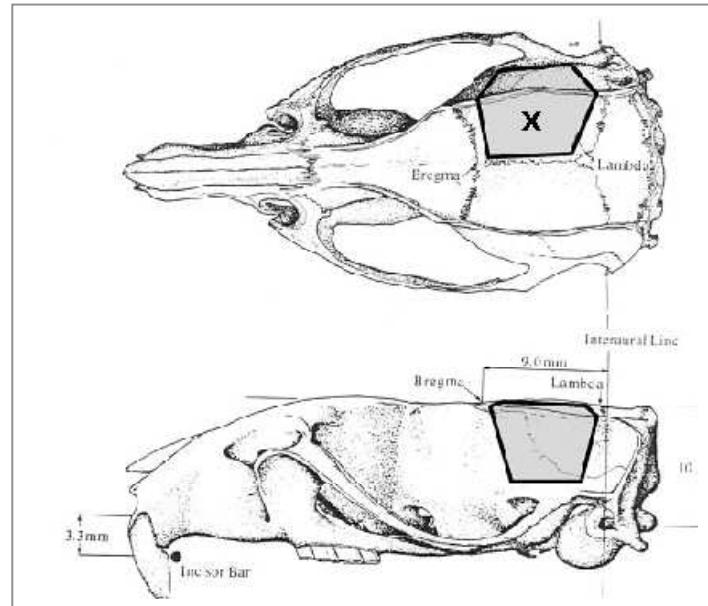


Abb.7: Inzisionspunkt (x) an Hand einer modifizierten Abbildung nach Pellegrino et al. des Rattenschädels⁹³

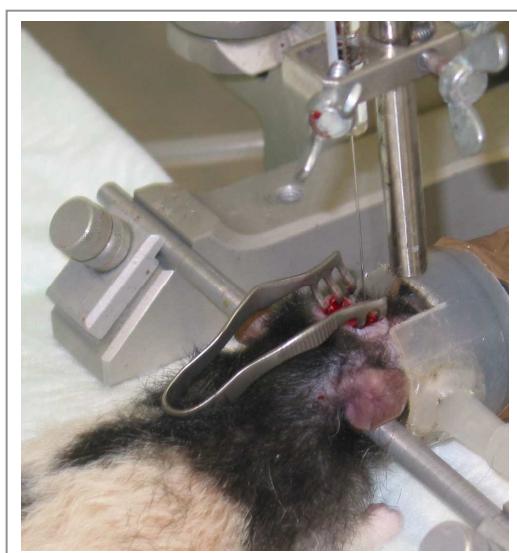


Abb.8: Intraoperatives Bild, Zeitpunkt der Tumorinjektion

6.2.2 MRT-Kontrolle

Um den Erfolg der Tumorimplantation bzw. der Therapie zu überprüfen, wurden die Tiere zu bestimmten Zeitpunkten einer Kontrolle mittels eines Magnetresonanz-Scans unterzogen.

Dazu wurden die Tiere vor Ort intramuskulär anästhesiert (0,1ml Ketamin-HCl (ratiopharm) + 0,1ml Rompun (Bayer) + 0,1ml NaCl).

Die Tiere wurden in die Armschiene des 1.5T MRT-Scanners (Magnetom Symphony, Siemens Medical Solutions) gelegt und um eine höhere Auflösung und damit eine präzisere Aussage zu erreichen, unter einem small loop coil (Siemens Medical Solutions) fixiert⁷⁶.

Nach der Untersuchung wurde der Aufwachprozess der Tiere ebenfalls überwacht.



Abb.9: a: Ratte in Armschiene;
b: Ratte unter loop coil

6.2.3 i.v.-Gabe von hMSC

Die von biochemischen Abteilung der medizinischen Poliklinik Innenstadt, München bezogenen genetisch veränderten Stammzellen Typ L87-Tie2-Tk²⁴ wurden dort kultiviert und am Tag der Gabe gelöst, gezählt und in PBS aufgenommen.

Die Tiere wurden mit Hilfe eines Vapor-Narkosemittelverdampfer (Dräger) (O_2 : 2 L/min; N_2O : 0,7 L/min; Isofluran (Abbott): 2 Vol%) nochmals kurzzeitig narkotisiert. Mittels einer Venenkanüle (Braun) wurde eine Schwanzvene punktiert und 2 Millionen Stammzellen in 0,5ml PBS gelöst langsam injiziert. Der Zeitpunkt der Gabe folgte dem vorgegebenen, im Kapitel Ergebnisse unter tierexperimentelle Untersuchungen dargestelltem Schema.

6.2.4 i.p.-Gabe von Ganciclovir

Das von der Thymidinkinase der L87-Tie2-Tk-Zellen aktivierte Ganciclovir (Roche), ein Virosstatikum und Analogon der Nukleinbase Guanin, wurde den Tieren nach besagtem Muster am zweiten und dritten Tag nach Stammzellgabe intraperitoneal injiziert. Dazu wurden die Ratten kurzzeitig aus ihrem Gehege genommen und ohne Narkose mit 6mg der Substanz, gelöst in 0,2ml NaCl (Natrium-Chlorid-Lösung), in einer Injektionsspritze, therapiert.

6.2.5 Präparation der Hirnresektate

Der Zeitpunkt der Tötung wurde wie folgt bestimmt: entweder gab es der festgelegte Zeitplan vor oder die Tiere zeigten vorher schon bei der täglichen Begutachtung neurologische Symptome wie eine Störung der Motorik oder verloren in relativ kurzen Zeitraum viel Gewicht, was auf eine vegetative Störung durch den sich vergrößernden Tumor hinwies.

Die Tiere wurden mit Hilfe von Ether unter einer Narkoseglocke getötet.

Durch einen okzipitalen Zugang wurde das Großhirn in Folge entnommen und unmittelbar im Anschluss zur weiteren Aufarbeitung in 4% Formalin bei Raumtemperatur oder in Kryomatrix bei -80°C eingelagert.

6.2.6 Aufarbeitung der Hirnresektate

Die Hirnresektate wurden mit Hilfe von Frau Angelika Henn aus dem Institut für Neuropathologie Großhadern unter der Leitung von Prof Dr Nikolaus Plesnila aufgearbeitet: Nach Fixierung des Resekts in gepuffertem 4% Formalin und 70% Ethanol erfolgte nach vorgegebenem Protokoll mit wiederholten Waschschritten in Ethanol in unterschiedlicher Konzentration sowie Aceton die Einbettung in Paraffin sowie die Anfertigung von Schnittpräparaten auf Tumorniveau mit einer Schichtdicke von 5-20 µm. Es wurde eine koronare Ebene gewählt. Die Präparate wurden auf Objektträgern fixiert. In abwechselnder Reihe folgte

nun eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und eine Immunhistochemie mit SV40-Antikörper (Calbiochem).

6.2.7 HE-Färbung der Hirnpräparate

Die auf Objektträgern fixierten Schnitte wurden im Folgenden bei Raumtemperatur mit dem Lösungsmittel Xylol (Roth) 15 Minuten lang entparaffinisiert, um das für die Stabilität während des Schneidevorgangs wichtige Medium wieder zu entfernen. Es schloss sich eine Waschreihe mit 100, 96 und 70 %igem Ethanol an, um die Präparate für den Färbevorgang sukzessive zu wässern.

Die Schnitte wurden nun in Hämalaun (Merck), dem basischen Hämaleinlack des Hämatoxylin, 6 Minuten inkubiert. Dieser Farbstoff verleiht allen basophilen Strukturen der Zelle, insbesondere dem Zellkern mit der DNA und dem rauen endoplasmatischen Retikulum, einen blauen Farbton. Mittels Wasser wurde nun das überschüssige Hämalaun 10 Minuten lang ausgewaschen und durch die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes kam es zu einer weiteren Verblauung des Hämatoxylins.

Ein weiterer Waschschritt mit 70%em Ethanol bereitete die 5 minütige Färbung in Eosin (Sigma) vor. Eosin färbt die lipophilen Zytoplasmastrukturen rot.

Eine Waschreihe mit destilliertem Wasser, 70, 96 sowie 100%igem Ethanol bewirkte eine erneute Entwässerung des Präparats, das nun wieder in Xylol inkubiert wurde.

Mittels des Klebstoffes Eukitt (Sigma) wurde ein Deckplättchen auf den Objektträgern fixiert und das Präparat somit haltbar gemacht.

6.2.8 Immunhistochemie der Hirnpräparate

Die Immunhistochemie der geschnittenen Hirnpräparate wurde modifiziert übernommen.¹⁰⁴ Je nach Fixationsweise wurden die Hirnschnitte unterschiedlich vorbereitet: Paraffinschnitte wurden mit einer Xylol-Alkoholreihe und einer Antigendemaksierung präpariert. Bei letzterer

wird das Objekt in einer Citrat-Puffer-Lösung 20 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Bei Gefrierschnitten genügte eine 30 sekündige Fixierung mit eisgekühltem Aceton.

Nun folgten drei fünfminütige Waschschrifte mit PBS. Um später falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde anschließend die endogene Peroxidase blockiert, da im sekundären Antiköperschritt eine Streptavidin-Peroxidase zur Signalverstärkung zum Einsatz kam.

Nach weiteren Waschzyklen mit einer Tris/Tween20-Lösung und einer einstündigen Hintergrundblockierung mit Protein Block (Dako), erfolgte die Gabe des primären Antiköpers anti-human SV40 large t-antigen (calbiochem) in einer Verdünnung von 1:50 in Antibody Diluent (Dako). Die Schnitte wurden nun über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach weiteren Waschschriften wurde nun der sekundäre Antikörper angewandt. Hier kamen zwei Optionen zum Einsatz: Erstens: die direkte Gabe des sekundären Antikörpers Texas Red anti-mouse oder FITC anti-mouse in einer Verdünnung von 1:20 oder zweitens: Es erfolgte zuerst eine Signalverstärkung mittels Biotin und Streptavidin-Peroxidase (Dako). Diese Methode dient der Vervielfältigung der Bindungsstellen für den sekundären Antikörper, um ein deutlicheres Signal zu erhalten. Der Fluoreszenzantikörper wurde anschließend 60 Minuten lang inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden die Objektträger eingedeckelt und standen zur mikroskopischen Dokumentation zur Verfügung.

7 Ergebnisse

7.1 Modifizierte, neuartige Methoden

7.1.1 Tube Formation Assay mit Endothelzellen und hMSCs

Wie in Abbildung Nr. 11 zu sehen, bilden Endothelzellen in einem Tube Formation Assay röhrenähnliche Strukturen.

Hier wurde der generelle Effekt von humanen mesenchymalen Stammzellen auf Glioblastomendothelzellen (GB-ECs) in Bezug auf tube formation in vitro getestet (getestete Kombinationen siehe Tabelle 1).

Während Stammzellen alleine auf Matrigel keine derartigen Formen ausbildeten (Abb. 13b), führte die Kombination aus GB-ECs und hMSCs zu einer kompletten Integration der Stammzellen in die Röhrenstrukturen der Endothelzellen (Abb. 12).

	Ø	hMSC	L87-Tie2-TK	L87-Tie2-RFP
GB-EC	✓	✓	✓	✓
KIM	✓	ng	-	ng
HUVEC	-	ng	ng	-
Ø	-	-	-	-

✓ = tubes; - = keine tubes; ng = nicht getestet

Tab.1: in Tube Formation Assay getestete Zelltypen und ihre Kombinationen

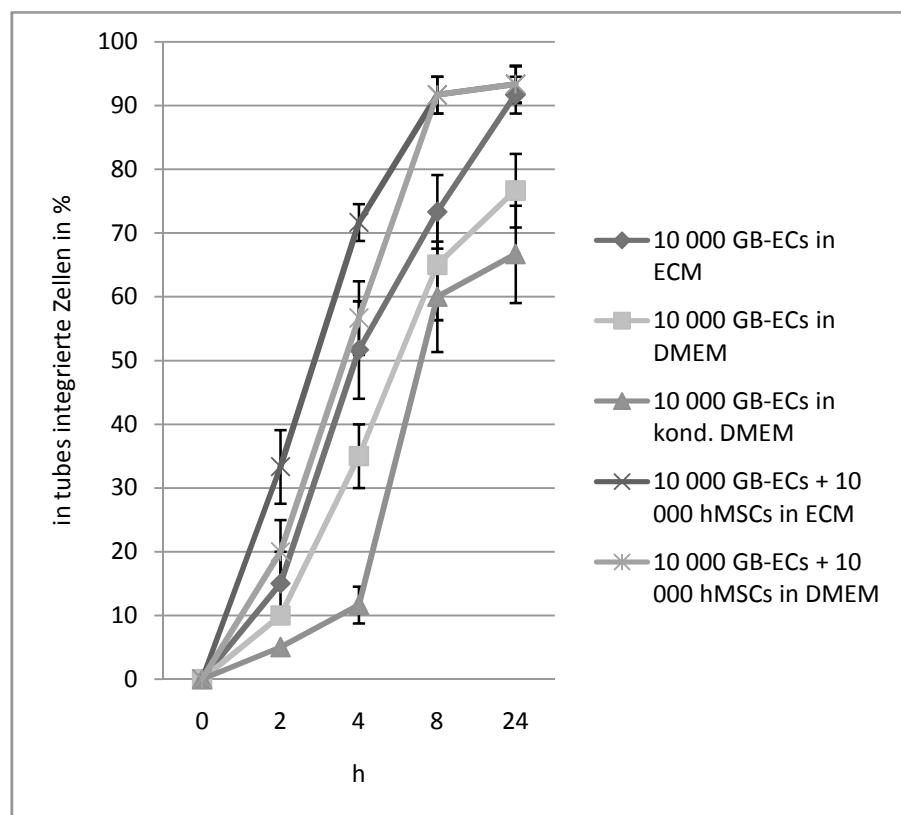
Bei aus gleicher Zellanzahl bestehenden Versuchen nur mit Endothelzellen sowie in einer Kombination mit Stammzellen schien die Zahl der entstehenden Röhrenstrukturen gleich. Anders sah es bei dem zeitlichen Zustandekommen der tubes aus:

In Anwesenheit von Stammzellen bilden die Zellen deutlich schneller ein Gebilde als Endothelzellen in Reinkultur (Abb. 10). Um auszuschließen, dass lösliche Botenstoffe, sezerniert von den Stammzellen, das Zustandekommen und das Wachstum der Endothelstrukturen fördern, wurde der Tropismus der GB-ECs zusätzlich in hMSC-konditioniertem Medium beobachtet (Abb. 13a): Es wurde kein positiver Effekt auf die Röhrenbildung festgestellt, im Gegenteil: wie in Abbildung Nr. 10 zu sehen, zeigten die Zellen unter Einfluss des konditionierten Mediums ein geringeres und langsameres Wachstum.

Darüberhinaus zeigten diese Experimente, dass sich die mesenchymalen Stammzellen des Typs L87-Tie2-RFP zwar in die Strukturen in vitro integrieren, sich aber nicht differenzieren. Diese Differenzierung wäre durch ein in Folge dieser exprimierte, rot fluoreszierendes Protein sichtbar geworden. Sie wurde nicht festgestellt.

Anders als bereits beschrieben¹³⁴ bildeten die als Kontrolle eingesetzten HUVEC-Zellen keine tubes aus. Die Gründe bleiben unklar und konnten auch bei wiederholten Versuchen nicht korrigiert werden. Die Versuche wurden trotz allem in die Ergebnisdarstellung mit aufgenommen, da sie zeigen, dass die HUVEC-Zellen auch nicht als zelluläre Stimulanz für Tumorzellen (hier des Typs L87-Tie2-RFP) zur Ausbildung von tubes dienten.

Abb. 10:
Röhrenbildung der angegebenen Zellkombinationen.
Werte sind in Prozent die in tubes bereits integrierten Zellen.
GB-ECs formieren sich in Kombination mit hMSCs schneller zu Röhren.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.



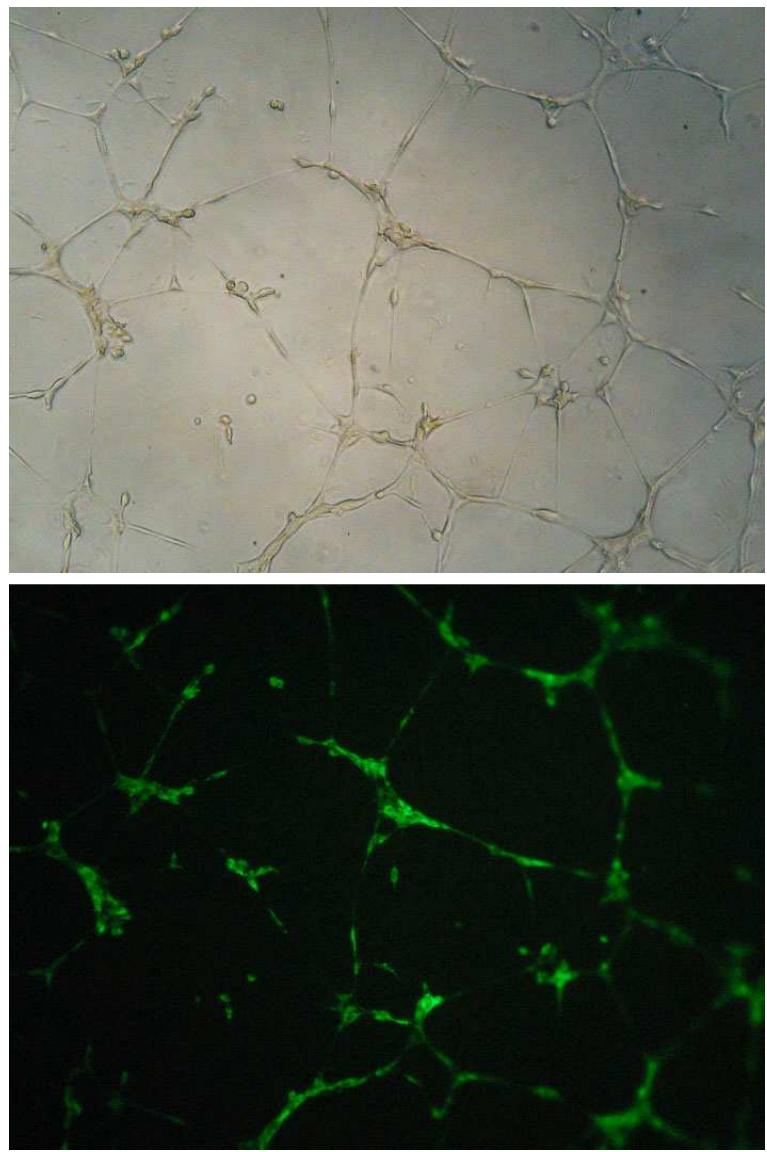


Abb.11:
Tube Formation Assay mit
10 000 GB-ECs, Aufnahme
nach 24h
a: Durchlichtmikroskop
b: Fluoreszenzmikroskop,
Zellen mit DiO gefärbt

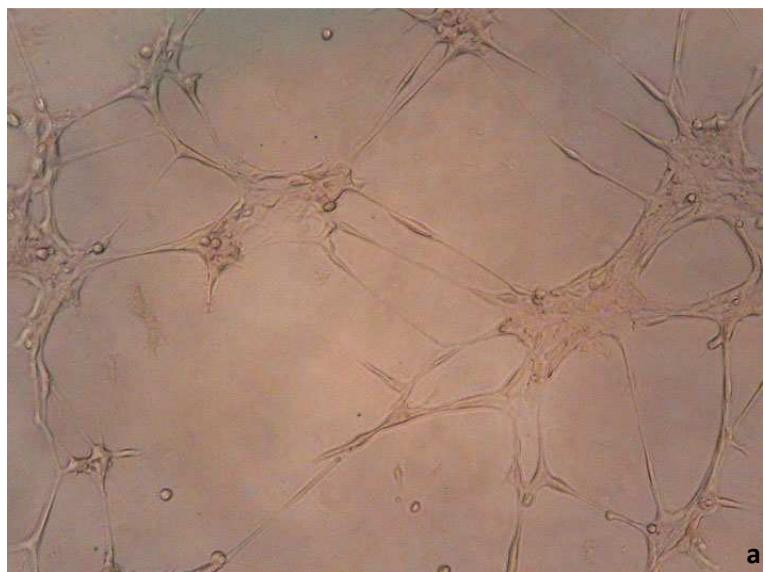


Abb.12:
Tube Formation Assay mit Co-Kultur aus 10 000 GB-ECs und 10 000 hMSCs, Aufnahme nach 24h

a: Durchlichtmikroskop
b: Fluoreszenzmikroskop, GB-ECs mit DiO grün, hMSCs mit Dil rot gefärbt

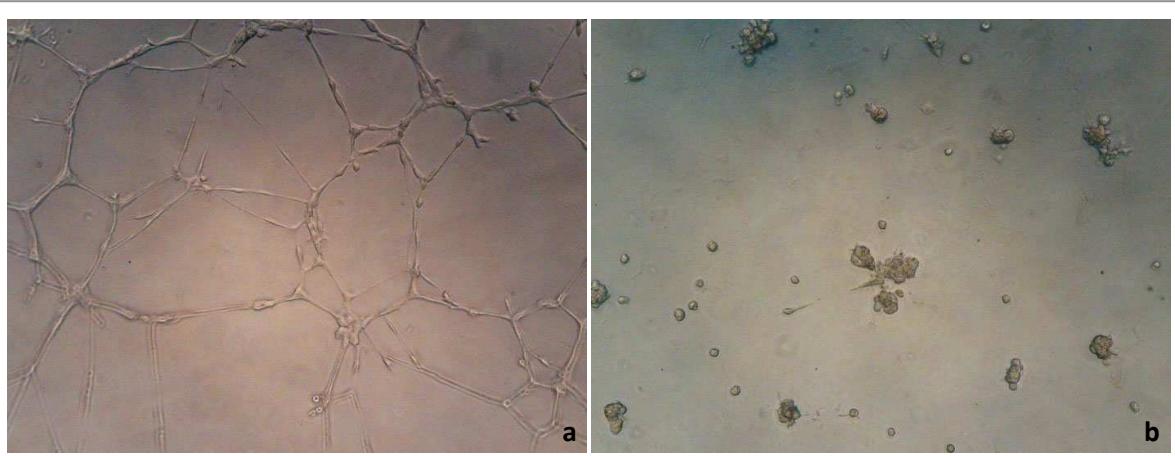
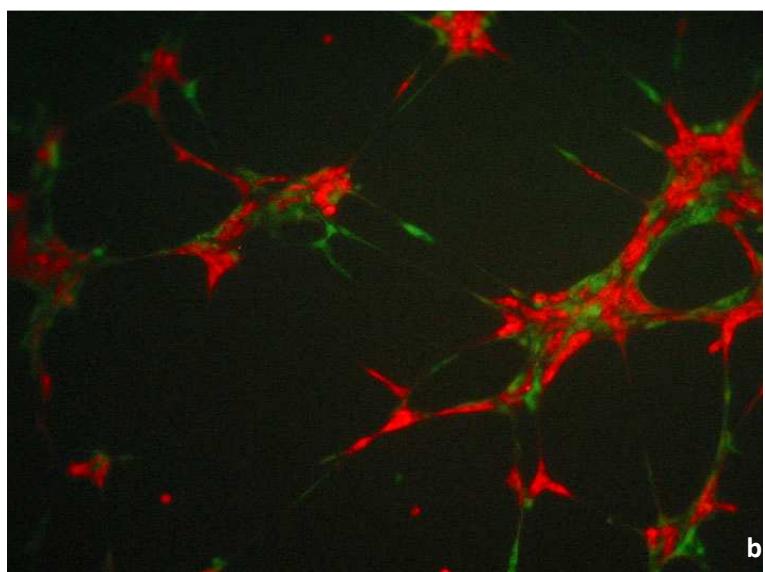


Abb.13: a: 10 000 GB-ECs in stammzellkonditioniertem Medium nach 24h, kein wesentlicher Unterschied zu unkonditionierter Nährlösung erkennbar; b: 10 000 hMSCs nach 24h, keine Röhrenbildung erkennbar

7.1.2 Sphäroide aus Tumorzellen und hMSCs

Zum Einen dienten diese Versuche der Untersuchung der Migrationseigenschaften von unterschiedlichen Zelltypen aus einem Sphäroid. Die Sphäroide, angesetzt mit einer Zellzahl von 3000, waren am Ende ihrer zweitägigen Bildungsphase im Schnitt $0,13\text{mm}^2$ groß. Es wurde nun ein deutlicher Unterschied in der erreichten Auswanderungsfläche von reinen Stammzellssphäroiden im Vergleich zu denen aus ausschließlich Tumorzellen oder gemischt aus Tumor- und Stammzellen sichtbar (Tab. 2, Abb. 14,15,16).

hMSCs wanderten nur eine geringe Strecke aus dem Sphäroid aus und vergrößerten die gemessene Fläche innerhalb von 48 Stunden durchschnittlich um den Faktor 3,34. Dahingegen wuchs die Fläche der Tumormigration im Mittel um das 22fache und die gemischter Sphäroide um das 25fache (Abb. 14). Zudem war es möglich, ein eindeutig stärkeres Migrationsverhalten aller getesteten Zellkombinationen auf mit Fibronectin oder Laminin benetzten im Vergleich zu unbeschichteten Böden zu verzeichnen (Abb. 14,15). Des Weiteren konnte ein das Migrationsverhalten hemmender Einfluss der genutzten Farbstoffe wie dies von Vince et al. vorbeschrieben worden war¹²⁷ nicht festgestellt werden (Abb. 15).

Zum Anderen lag ein Augenmerk auf einem möglichen Motilitätsunterschied von Stammzellen und Tumorzellen aus einem gemischten Sphäroid heraus. Hier war keine Diskrepanz zwischen den Zelltypen festzustellen. Die Zellarten verteilten sich homogen in der Migrationsfläche. Auch die zuvor geringe Wanderungsstrecke von hMSCs aus einem reinen Stammzellssphäroid ließ sich hier nicht bestätigen. Diese migrierten ebenso weit wie Tumorzellen (Abb. 16c,17,18).

Darüberhinaus konnte eine im Vergleich zur Co-Kultur hohe Anzahl von aus gemischten Sphäroiden ausgewanderten Zellen notiert werden, die nach der zweitägigen Sphäroidbildungsphase mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Diese verteilten sich ebenso homogen und zeigten kein differenziertes Migrationsverhalten (Abb. 18).

	Ø	U373	U373 DiO	U373 GFP
hMSC	✓			
hMSC Dil	✓		✓	✓
U373	✓			
U373 DiO	✓			
U373 GFP	✓			

Tab.2: getestete Sphäroidkombinationen

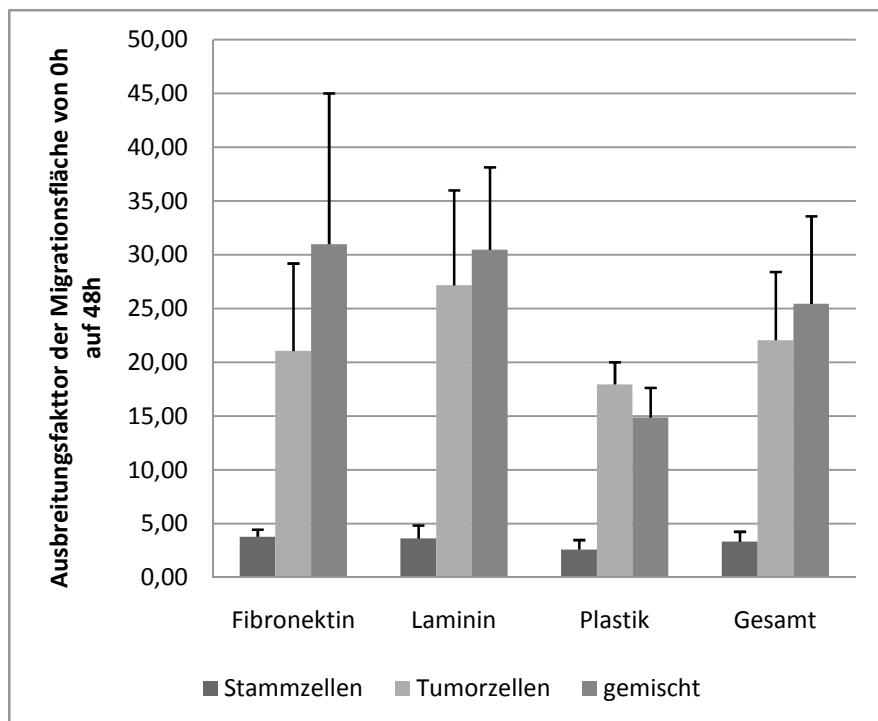


Abb.14:
Ausbreitungsfaktor der Migrationsfläche von 0h auf 48h
Deutlich gesteigerte Migration von Zellen aus Tumor- bzw. gemischten Sphäroiden im Vergleich zu hMSC-Sphäroiden sowie ein fördernder Einfluss der Proteine Fibronektin und Laminin auf die Auswanderungsstrecke.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

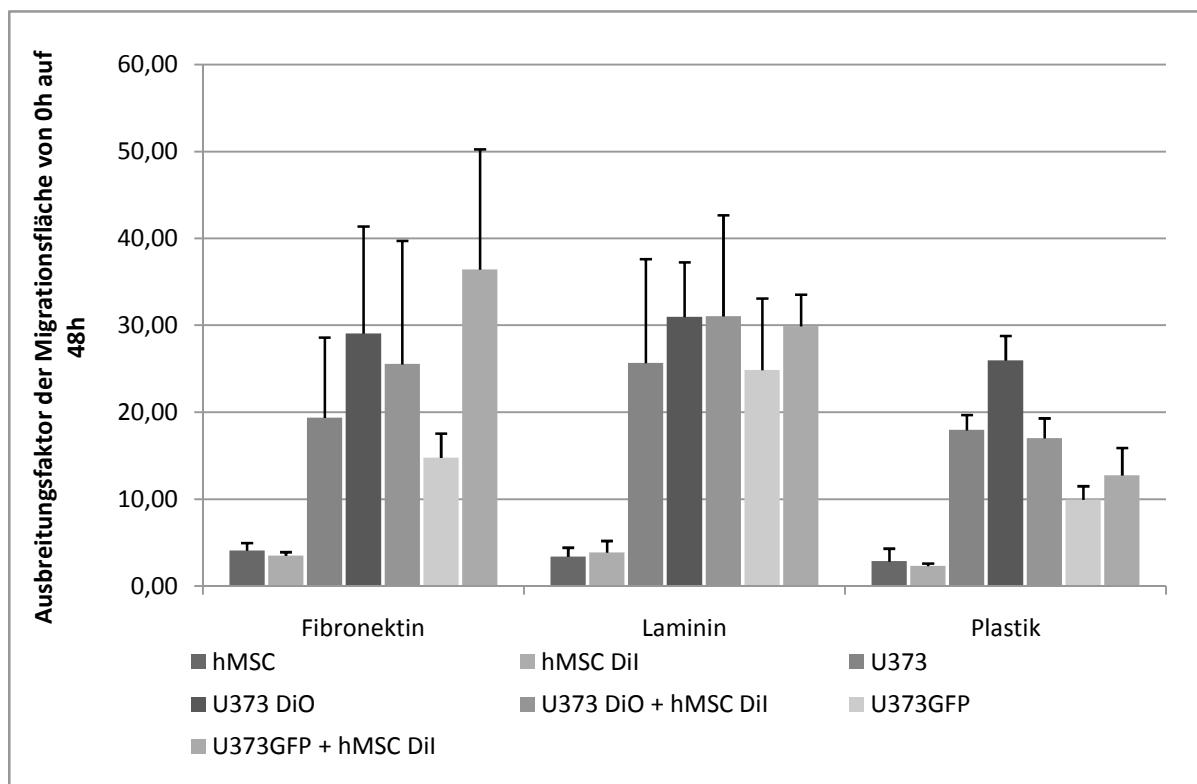


Abb.15: Aufteilung des Ausbreitungsfaktors in alle getesteten Zellkombinationen.
Es ist kein negativer Einfluss der Farbstoffe auf das Migrationsverhalten der Zellen zu erkennen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

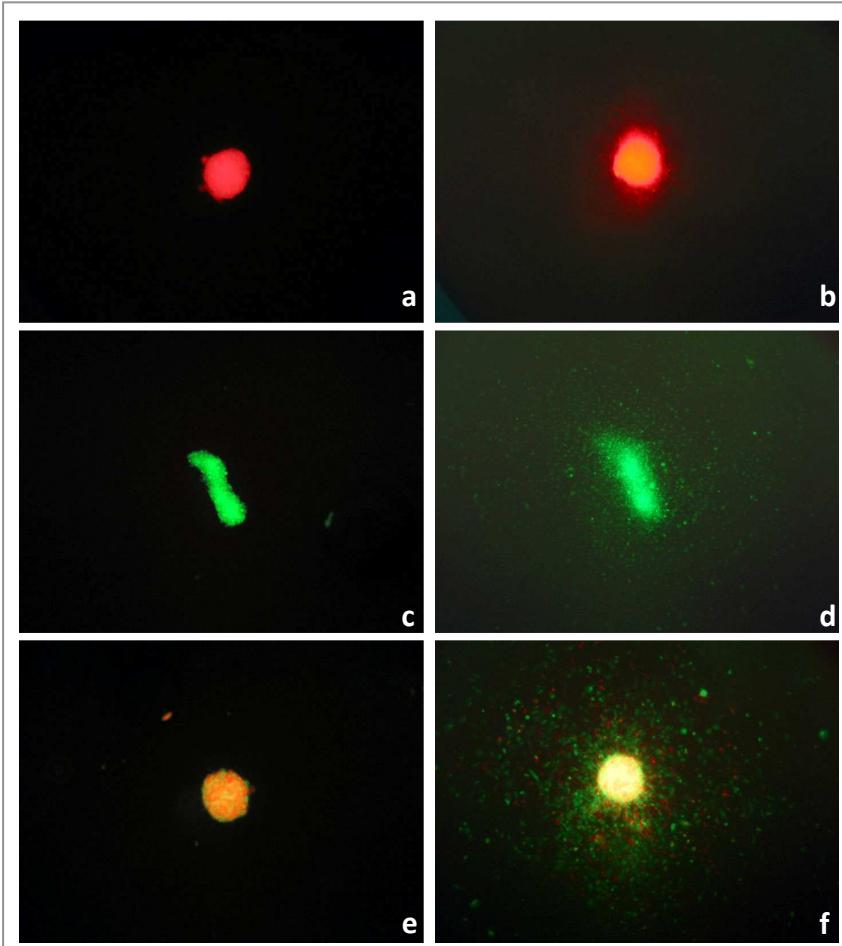


Abb.16:

a, b: hMSC-Sphäroid, Dil rot gefärbt, auf Laminin, 0 -> 48h

c, d: Tumor-Sphäroid, U373 DiO grün gefärbt, auf Laminin, 0 -> 48h

e, f: gemischter Sphäroid, hMSC Dil rot gefärbt, U373 GFP, auf Laminin, 0 -> 48h

Deutlich ist das stärkere Migrationsverhalten des Tumor- und des gemischten Sphäroids gegenüber dem Stammzellssphäroid zu erkennen

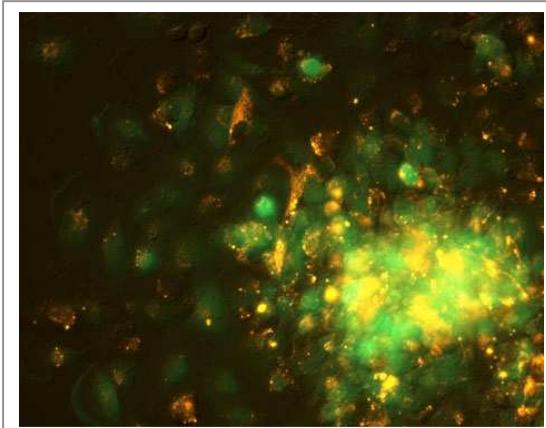


Abb.17: Sphäroid aus 1500 hMSCs Dil und 1500 U373GFP, 24h nach Aussaat, Bild mittels Kombination aus Fluoreszenz- und DIC-Durchlicht-Mikroskopie:
Homogene Verteilung aller Zelltypen in der Migrationsfläche sowie ein großer Anteil zweifarbig Zellen

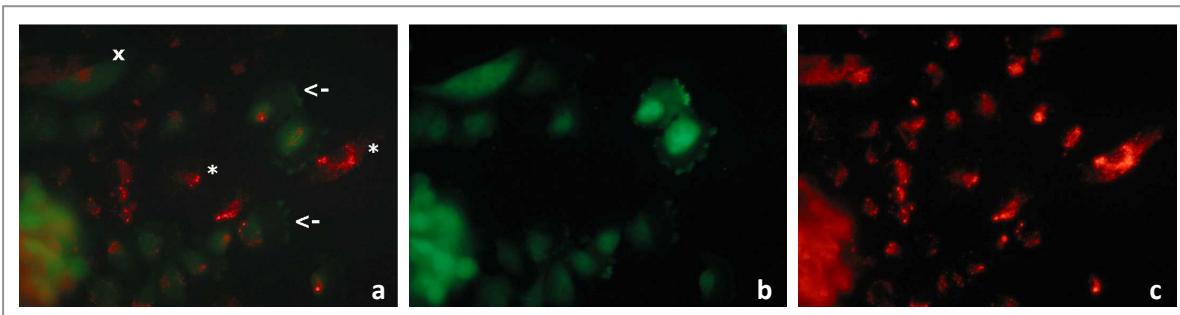


Abb.18: Fluoreszenzaufnahme der Migrationsfläche. U373GFP und hMSC Dil, nach 24h, Sphäroid links unten. Es sind sowohl migrierte grüne Tumorzellen (x), rote Stammzellen (*) als auch zweifarbiges(<->) zu erkennen

7.2 Interaktion von Gliomzellen und hMSCs als funktionelles Synzytium

7.2.1 Gap junction vermittelter Austausch von Calcein in Co-Kulturen von Gliom- und Stammzellen

Die Co-Kultur diente dem Nachweis von Kommunikation via gap junctions zwischen Stammzellen und Glioblastom- bzw. Glioblastomendothelzellen. Die erste Fragestellung richtete sich hier danach, ob diese Art von Austausch überhaupt zu Stande kommt. Tabelle 3 gibt eine Übersicht, welche Kombinationen erfolgreich getestet wurden. Bei jeder geprüften Variation kam es auch zu einem Austausch des Calceins. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob der Transfer bidirektional abläuft, das heißt, ob der Farbstofftransfer in beide Richtungen vollzogen wurde. Dies konnte ebenso bewiesen werden (siehe Tabelle 3).

Die Anzahl der beobachteten Übertragungen des Farbstoffes nahm im zeitlichen Verlauf zu, abhängig von Wachstums- und Ausbreitungsgeschwindigkeit der mit Calcein beladenen Zellen. Am als Versuchsende festgelegten Zeitpunkt nach vier Stunden konnte im größten Teil aller Fälle in den gesamten, die Calceinzelle umgebenen Dil-markierten Zellen ein stattgefunder Farbtransfer festgehalten werden (Abb. 19, 20).

	hMSC	Km isol hMSC	Tu isol hMSC	L87-Tie2-TK	GB-EC	U87	U251	U373	Astrozyten	HUVEC
hMSC	X	O	O	O	X	X	X	X	X	X
Km isol hMSC	O	X	O	O	X	X	X	X	X	X
Tu isol hMSC	O	O	X	O	O	X	O	O	O	X
L87-Tie2-TK	O	O	O	X	X	X	X	X	O	O
GB-EC	X	X	O	X	X	X	O	O	X	O
U87	X	X	X	X	X	X	O	O	X	O
U251	X	X	O	X	O	O	X	O	O	O
U373	X	X	O	X	O	O	O	X	O	O
Astrozyten	X	X	O	O	X	X	O	O	X	O
HUVEC	X	X	X	O	O	O	O	O	O	X

Tab.3: Transfer von Calcein AM in Co-Kulturen. Transfer erfolgte in beide Richtungen. X = Transfer von Calcein, O = nicht getestet

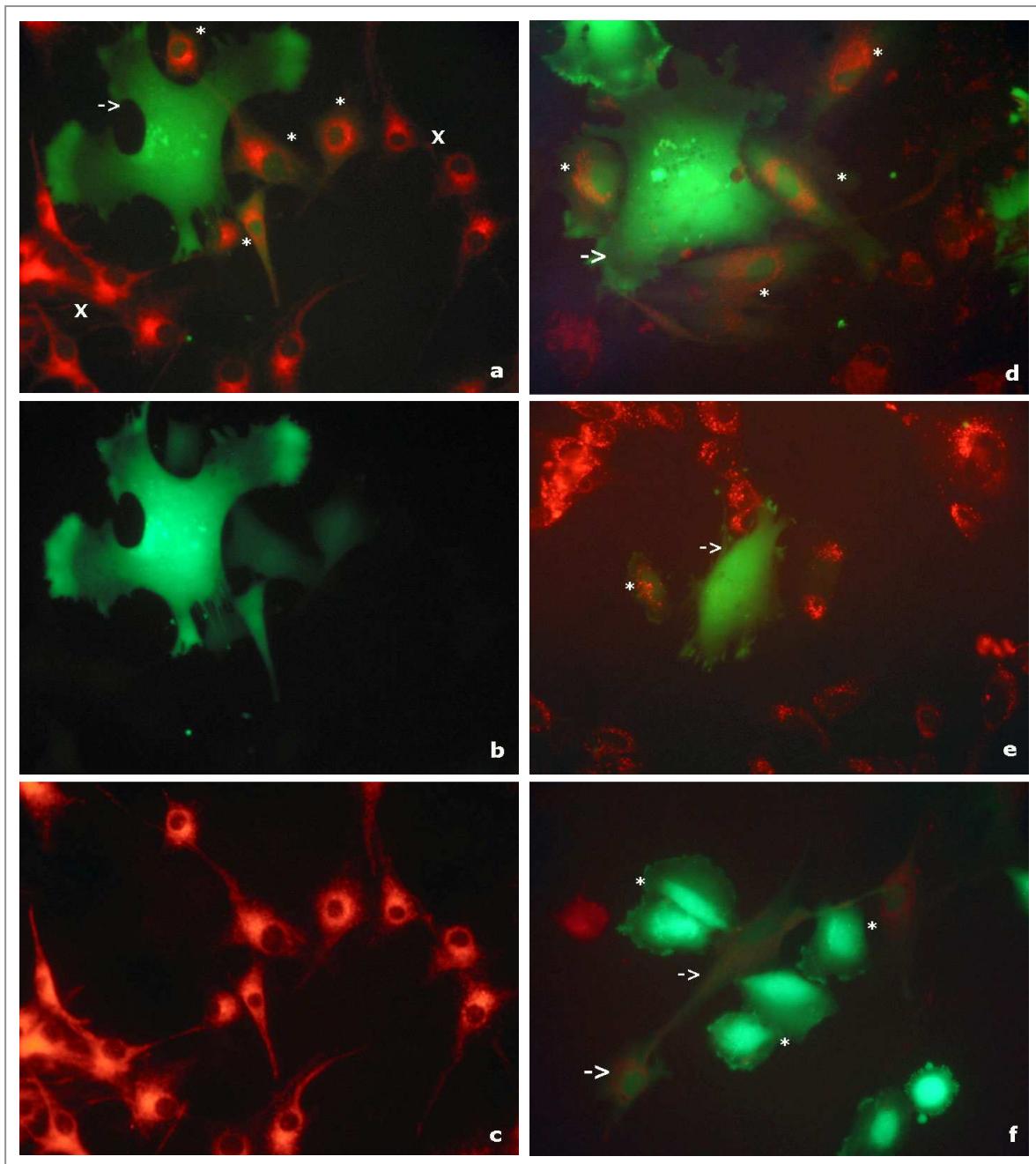


Abb.19: a,b,c: Fluoreszenzaufnahme, U87 mit Dil rot (x), hMSC mit Calcein grün (->), Transfer des Calceins in naheliegende Tumorzellen (*) nach 4h;
 d: hMSC Calcein (->), GB-ECs Dil mit von Stammzelle erlangtem Calcein (*) nach 1,5h;
 e: hMSC Calcein (->), Astrozyt Dil mit von Stammzelle erlangtem Calcein (*) nach 2h;
 f: U373-Tumorzellen mit Calcein (*), hMSC Dil mit von Tumorzellen erlangtem Calcein (->) nach 4h



Abb.20: a: Fluoreszenzaufnahme: Knochenmark isolierte hMSC mit Calcein grün (->), U87 Dil (x) sowie mit gelungenem Calceintransfer (*);
b: Phasenkontrastmikroskopie; c: Kombination aus Fluoreszenz- und DIC-Mikroskopie: das Calcein füllt die gesamte Stammzelle aus

Hier wurde auch der sogenannte Schneeball-Effekt überprüft. Dies bezeichnet die Weitergabe des Calceins ausgehend von einer Zelle auf eine zweite sowie von dieser ausgehend auf weitere.

Im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten wurde zuerst versucht, mit Hilfe des auf dem Mikroskop verankerten Koordinatensystems und eines Fixierungsrahmens für die Mikrotiterplatte an jedem Dokumentationszeitpunkt die exakt gleiche Stelle wiederzufinden und so die zeitliche Entwicklung bzw. die Calceinweitergabe zu beobachten. Ein bestmögliches Ergebnis ist in Abbildung 21 zu sehen. Hierbei traten folgende Schwierigkeiten auf: Die Präzision des Koordinatensystems erwies sich verbunden mit der Migration der Zellen als ungenügend, um rasch den gleichen Ort in den Fokus zu nehmen. Des Weiteren konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der Calceintransfer nicht aus einer außerhalb des Gesichtsfeld liegenden Zelle stammt, die im Dokumentationsintervall die Zellen tangierte. Eine Verkürzung der Intervalle unter eine Stunde hatte inklusive der ungünstigen Wachstumsbedingungen außerhalb des Inkubatorschranks zur Folge, dass die Fluoreszenz unter dem Einfluss des UV-Lichts der Quecksilberlampe ausbleichte und nicht den gesamten Dokumentationszeitraum überdauerte.

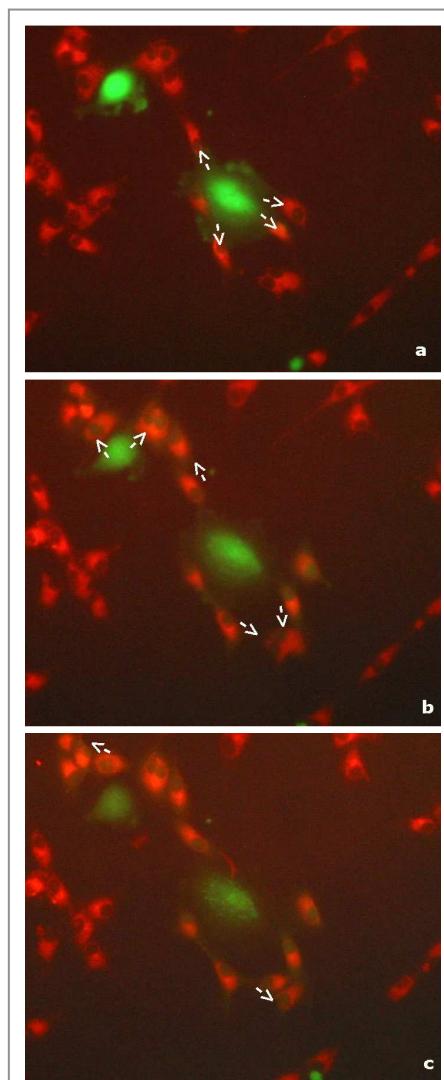


Abb.21: Schneeball-Effekt: hMSC Calcein, U87 Dil, Bilder nach 1h (a), 2h (b) und 3h (c)

Letzteres war auch der limitierende Faktor des zuvor beschriebenen Inkubatormikroskops³⁹. Hier konnten alle das Wachstum negativ beeinflussenden Faktoren beseitigt werden. Trotzdem gelang keine ansprechende Darstellung eines Weitergabe-Effekts wegen des Verbleibens der Fluoreszenz und der zytotoxischen Wirkung der Strahlung.

Ein weiterer Anlauf war das alternative Vorgehen, Stammzellen in einem Sphäroid unmittelbar vor der Aussaat mit Calcein zu beladen und diesen auf einen dichten Rasen mit dem Lipophilic Tracer Dil rot markierten Tumorzellen zu positionieren. Dies hatte den Vorteil, dass der Transfer nur von einem fixierten Zellpunkt aus geschehen konnte. Allerdings scheiterte der Beweis zum Einen an dem Ausbleichen des Farbstoffes durch Strahlung sowie an Abbauprozessen durch die Zellen und zum Anderen konnte in dem dadurch zur Verfügung stehenden Beobachtungsfenster kein Transfer dokumentiert werden.

Eine letzte durchgeführte Möglichkeit war ein Ansatz mit drei Farbstoffen: Stammzellen wurden wie gewohnt mit Calcein AM grün markiert, ein Tumorzelltyp rot mit Dil und weitere Zellen derselben Zellart mit Calcein Blue, einem blauen Farbstoff. Ziel war es, einen Transfer von Calcein AM und Calcein Blue in eine und dieselbe rote Zelle zu beobachten. Hier war die hohe Zytotoxizität sowie das extrem schnelle Ausbleichen des Calcein Blue der verhindernde Faktor.

7.2.2 Gap junction Inhibition mittels Glycyrrhetininsäure (AGA)

Als Beweis, dass der Fluoreszenzfarbstoff Calcein über gap junctions und nicht über andere Kommunikationsarten ausgetauscht wurde, diente die unspezifische Inhibition dieser mittels Glycyrrhetininsäure, kurz AGA.

Es ließ sich zeigen, dass die Anzahl der Calcein-Transfers aus einer Zelle in die umliegenden Zellen mit steigender AGA-Konzentration im Medium abnahm: Konnte man nach 2,5 Stunden bei 0µM AGA im Schnitt 1,93 Transfers beobachten, gingen die Übertritte bei 50µM auf 0,3 pro mit Calcein beladener Zelle zurück (Abb. 22).

Die Reversibilität dieser Blockierung ließ sich durch Entfernen der Glycyrrhetininsäure nach 2 Stunden Inkubation, einem PBS-Waschschnitt sowie durch Resuspension mit frischem Medium zeigen: 4 Stunden nach Versuchsbeginn konnte auch bei mit sehr hohen AGA-

Konzentrationen (250-1000 μ M) blockierten gap junctions wieder eine Kommunikation über dieselben dokumentiert werden (Abb. 23).

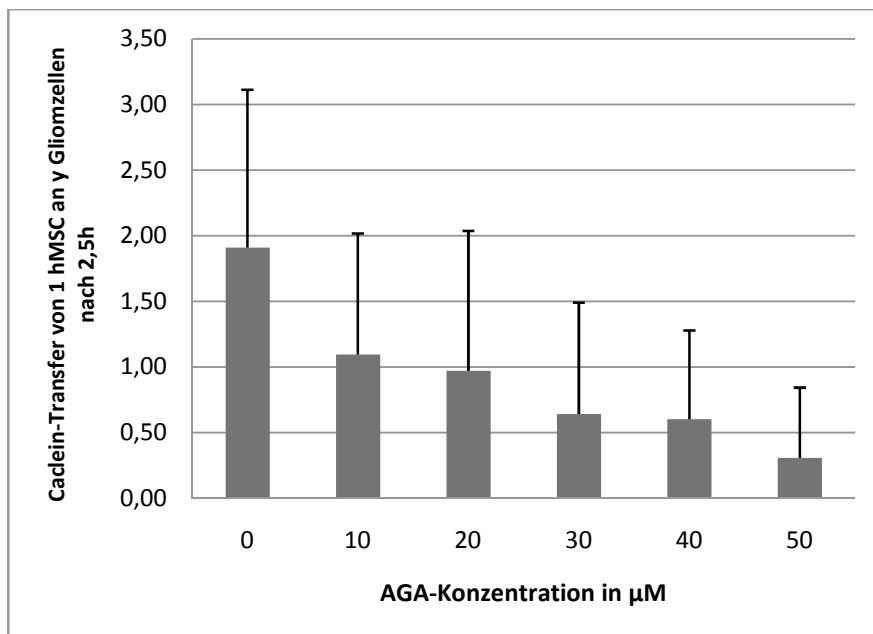


Abb.22: Konzentrations-abhängige Inhibition des Calcein-Transfers über gap junctions
In einer Co-Kultur getestet inhibiert die steigende AGA-Konzentration die Calcein-Aufnahme von Gliomzellen aus mit Calcein beladenen hMSCs.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

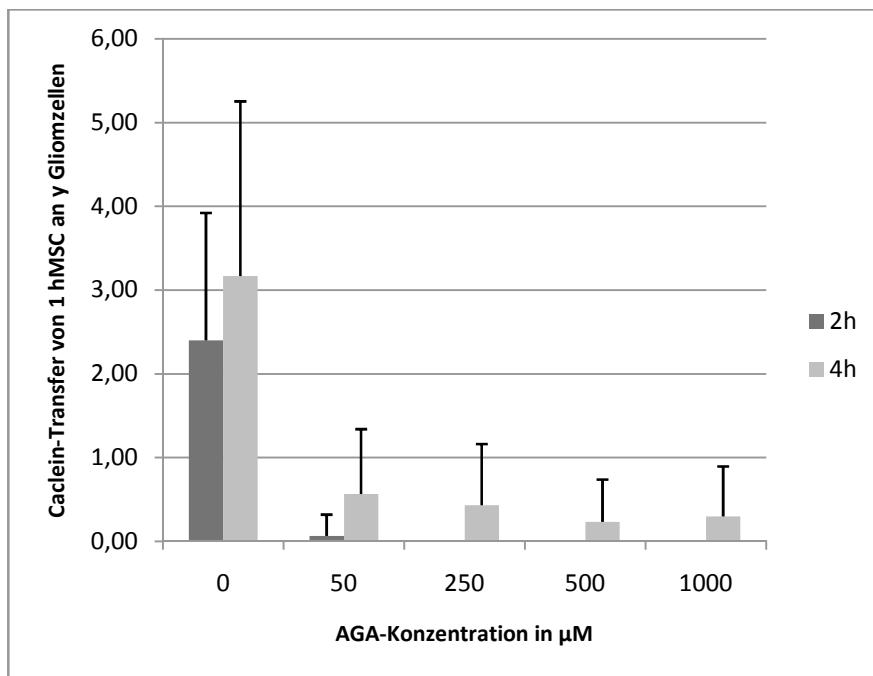


Abb.23: Reversibilität der gap junction Inhibition durch AGA
Nach einem Waschschritt nimmt die Anzahl der Calcein-Transfers zu.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

7.2.3 Connexin-Nachweis mittels Immunzytochemie

Mittels Immunozytochemie konnte Connexin 43 bei folgenden Zelltypen nachgewiesen werden: bei den Stammzellvarianten hMSC und L87-Tie2-Tk, bei Gliomendothelzellen, bei den Gliomzelllinien U87, U251, U373 sowie bei Astrozyten und HUVEC.

Der Nachweis der Connexine 37, 40 und 45 gelang mittels dieses Verfahrens weder bei besagten Zelltypen noch bei den jeweiligen Positivkontrollen bestehend aus mit dem entsprechenden Connexinen transfizierten HeLa-Zellen.

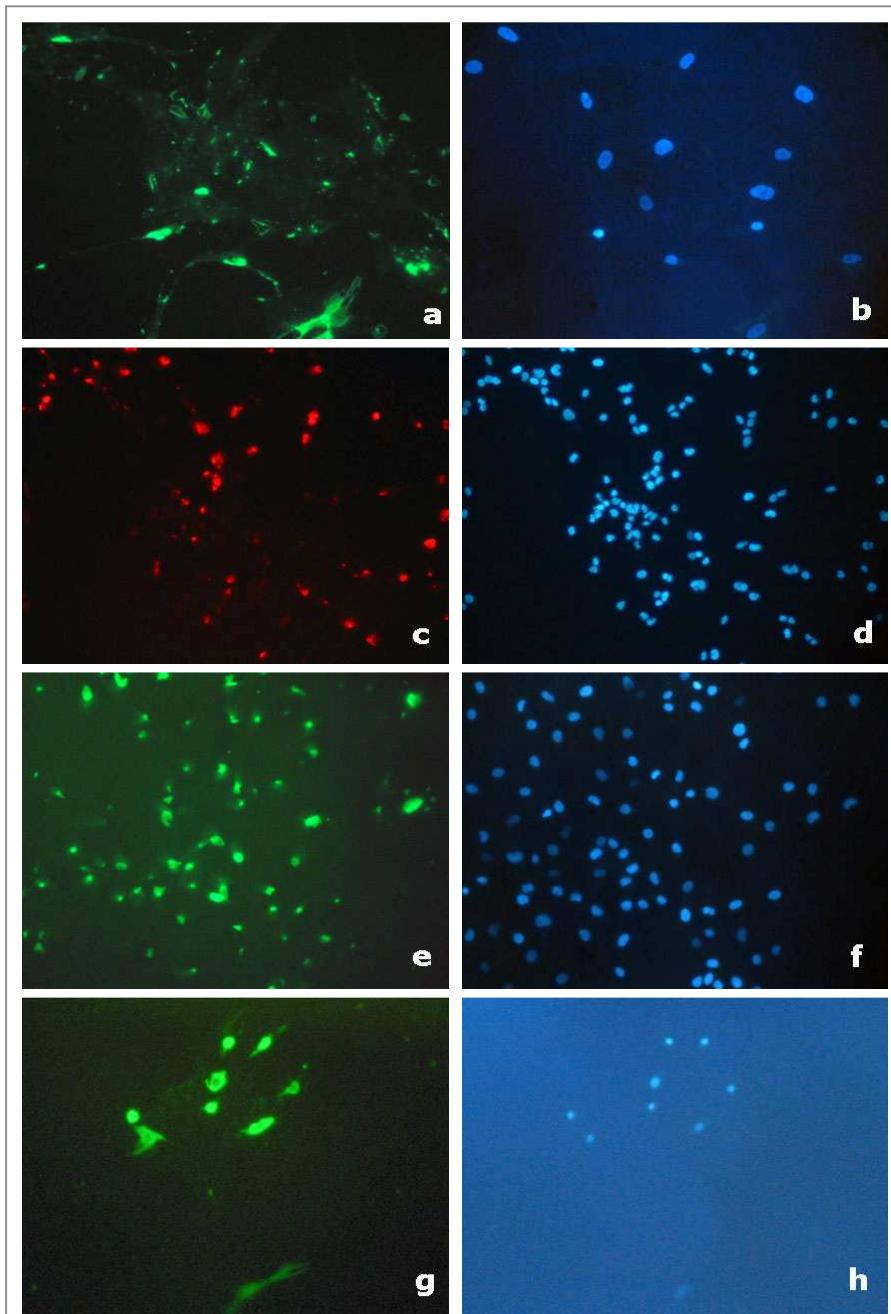


Abb.24:
Cx43-Färbung mittels
Immunozytochemie:
a: hMSC mit FITC, b:
entsprechende DAPI-
Kernfärbung
c,d: L87-Tie2-TK mit
Texas Red und DAPI
e,f: GB-EC mit FITC
und DAPI
g,h: U87-Gliomzellen
mit FITC und DAPI

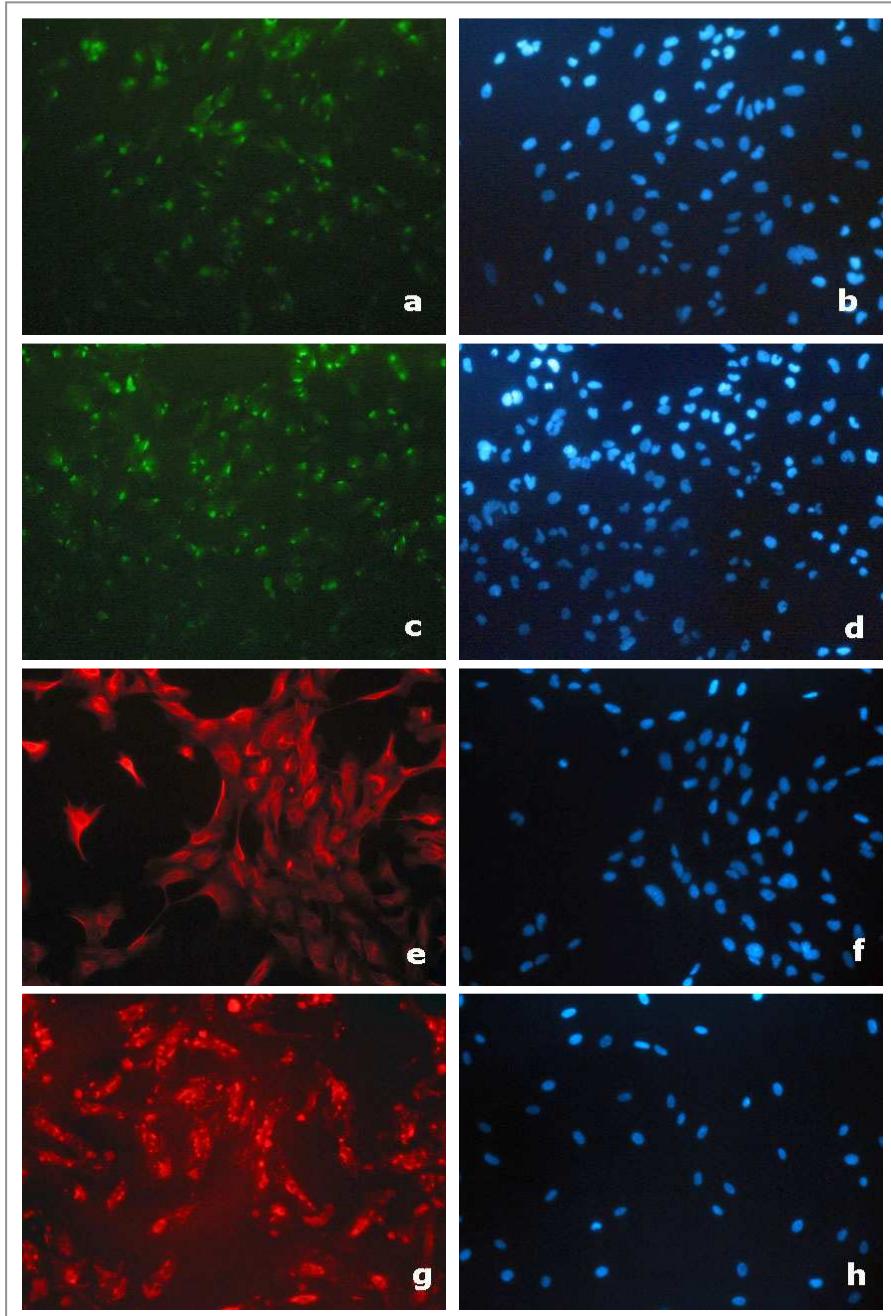


Abb.25:
Cx43-Färbung mittels
Immunzytochemie:
a: U251 Gliomzellen
mit FITC, b: entsprechende
DAPI-Kernfärbung
c,d: U373 mit FITC und
DAPI
e,f: Astrozyten mit
Texas Red und DAPI
g,h: HUVEC mit Texas
Red und DAPI

7.2.4 Connexin-Nachweis mittels Western Blot

Die Proteinextrakte der Stammzelltypen hMSC und L87-Tie2-Tk, der Gliomzellvarianten U87, U251 und U373 sowie von Glioblastomendothelzellen, Astrozyten und HUVECs wurden mittels Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert.

Connexin43 wurde mit geringerer Menge bei L87-Tie2-Tk, U251 und U373 in allen Proben gefunden. Connexin36 wurde bis auf die hMSCs ebenso bei allen Zelltypen nachgewiesen.

Mit dem Antikörper gegen Cx26/30/32 konnte eine dünne Bande bei humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden, die vermutlich Connexin30 repräsentiert. Weitere Connexine wie Cx32 und Cx37 konnten nicht nachgewiesen werden, gaben aber in der Positivkontrolle ein Signal. Cx40 und Cx45 konnten weder in den Proben noch in der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Connexine unter der Nachweisgrenze dieser Methode exprimiert werden.

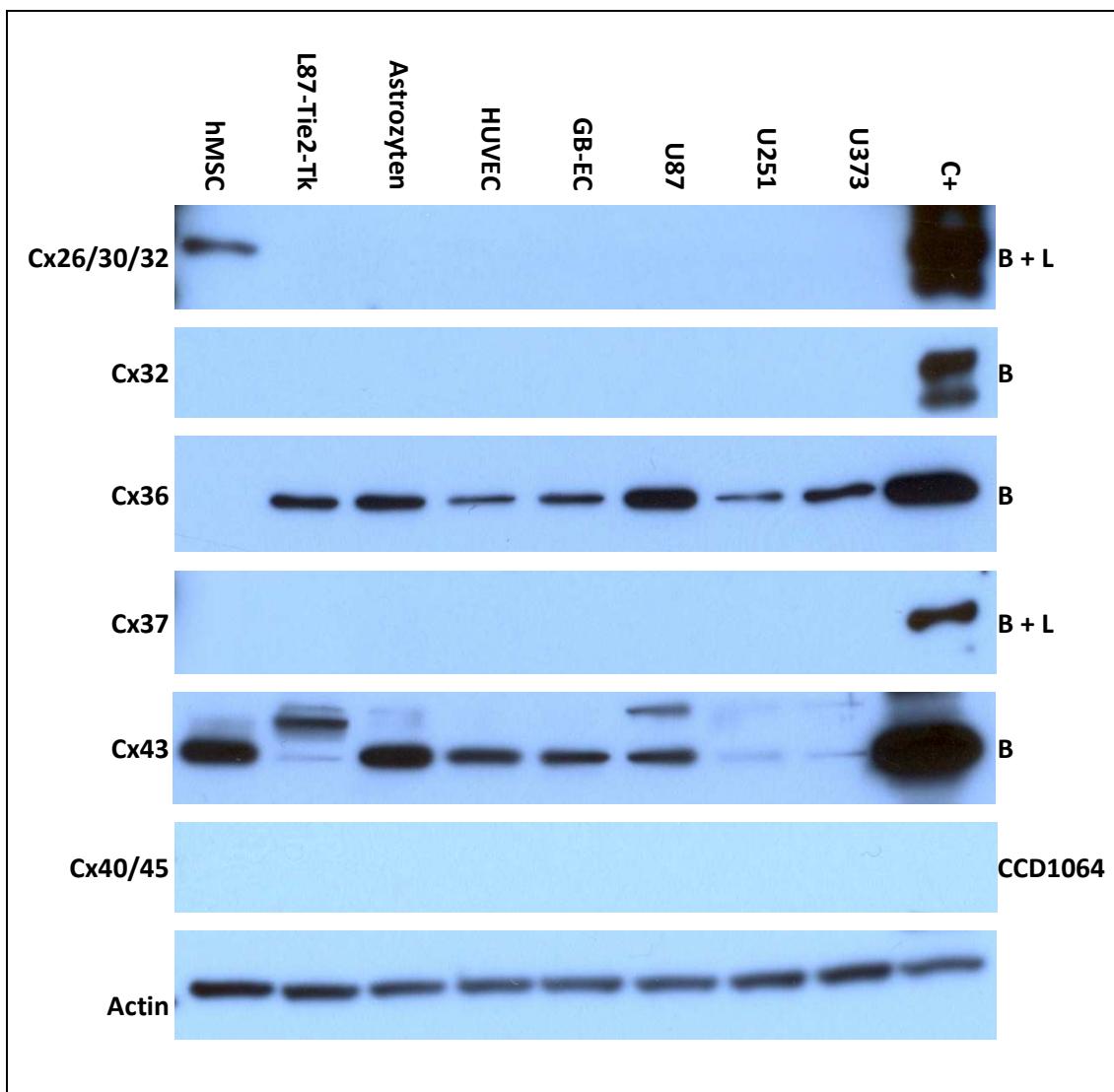


Abb.26: Western Blot Analyse der Zelltypen: hMSC, L87-Tie2-TK, Astrozyten, HUVEC, Tumorendothelzellen (GB-EC), Gliomzelllinien U87, Z251, U373 auf die Connexine 26/30/32, 32, 36, 37, 49, 43, 45. Actin als Proteinkontrolle. Die Positivkontrollen: B = rat brain extract, L = rat liver extract, CCD1064 = CCD1064Sk cell lysate

7.3 Interaktion von Gliomzellen und hMSCs als strukturelles Synzytium

7.3.1 Fusions-Nachweis mittels Lipophilic Tracers

Mit den Lipophilic Tracers wurden nun Farbstoffe genutzt, die aufgrund ihrer Größe und Zelllokalisierung nicht mehr über die Kanäle von gap junctions austauschbar sind. Eine Farbstoffaufnahme von einer zweiten Zelle kann nur durch Membranaustausch oder -fusion erklärt werden.

Auch hier stand wieder im Vordergrund, ob eine Fusion zwischen Stammzellen und Gliomzellen zu Stande kommt. Tabelle 4 zeigt die erfolgreich durchgeführten Kombinationen. In

	U87	U251	U373	GB-EC	HUVEC	Astrozyten
hMSC	x	x	x	x	x	x
L87-Tie2-TK	x	x	x	x	x	x

allen Fällen konnten nach 24 Stunden Zellen mit beiden

Tab.4: erfolgreich getestete Co-Kulturen mit Lipophilic Tracers

Farbstoffen markiert gefunden werden (Abb. 28, 29, 30). Die detektierte Anzahl zweifarbiger Zellen konnte nach 48 Stunden gesteigert werden. Wie in Abbildung 27 zu sehen, konnten Fusionen im Bereich zwischen 3 bis 7 Promille nach 24h und 8 bis 11 Promille nach 48h auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen gezählt werden.

Die Frage, ob es sich nun um komplett Zellverschmelzungen handelte, die in einer Zelle mit zwei Zellkernen enden würden, konnte quantitativ nicht ausreichend geklärt werden. Der Versuch, die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zu färben, brachte ungenügende Resultate: Eine Färbung noch lebender Zellen führte zu einer Markierung von maximal zehn Prozent aller vorhandenen Zellen. Durch eine Fixierung mittels Methanol oder Paraformaldehyd wurden die Lipophilic Tracers zum größten Teil ausgewaschen und ließen eine korrekte Quantifizierung nicht mehr zu. Dennoch konnten vereinzelt zweifarbig markierte Zellen mit ebenso zwei Kernen dokumentiert werden (Abb. 30).

Eine weitere Erkenntnis dieser Experimente betrifft die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb einer Zelle: Während sich das in den vorherigen Versuchen verwendete Calcein im gesamten Zytoplasma gleichmäßig ubiquitär verteilte, markierten die Lipophilic Tracers bestimmte Membranstrukturen der Zelle. Mittels einer Kombination aus Fluoreszenz- und DIC/Phasenkontrastmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die hier genutzten Farbstoffe keine Zellgrenzen markieren und sich ungleichmäßig in einer Zelle anreichern (Abb. 28b).

Dies gestaltete die Abgrenzung von Zellen untereinander schwierig, da im reinen Fluoreszenzbild nicht eindeutig die Kontaktzonen zu erkennen waren.

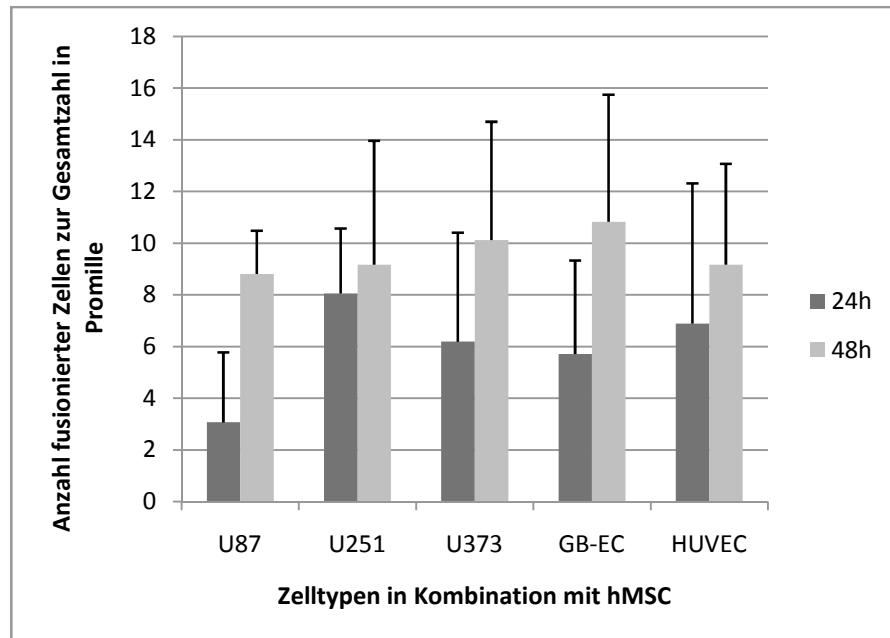


Abb.27:
Anzahl detektierter fusionierter Zellen aus Stammzellen und Gliomzellen im zeitlichen Verlauf nach 24h und 48h.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

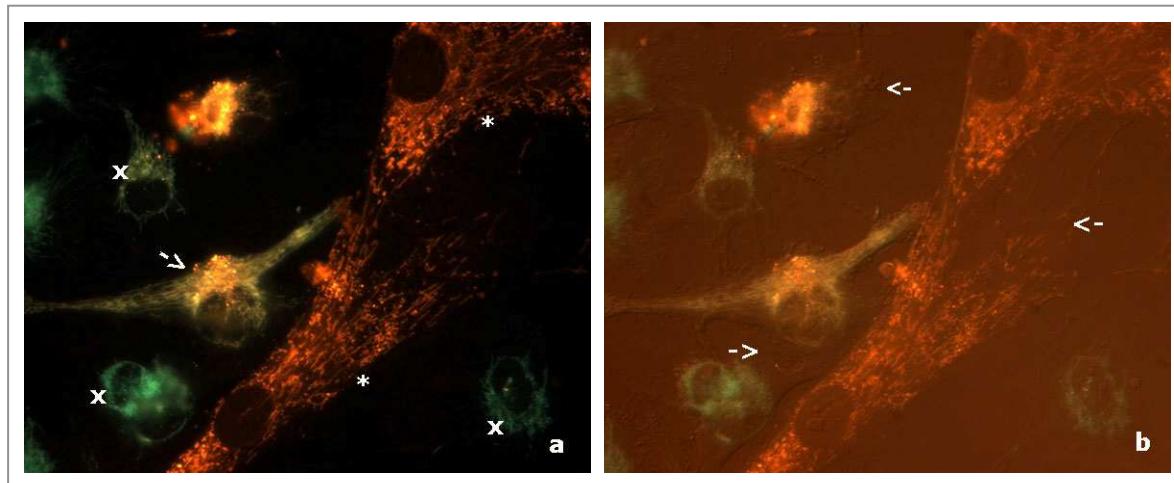


Abb. 28: a: hMSC mit Dil rot gefärbt (*), U373 Gliomzellen mit DiO grün gefärbt (x), Pfeil weist auf eine fusionierte Zelle, Aufnahme nach 24h
b: Kombination aus Fluoreszenz- und DIC-Mikroskopie: Pfeile weisen auf nicht mit Farbstoff markierte Zytoplasmaräume

Abb.29: a: Pfeil weist auf fusionierte Zelle mit möglicherweise zwei Kernen in einer Co-Kultur aus GB-ECs und hMSCs, Aufnahme nach 48h
b, c: Monolichtfilter derselben Aufnahme

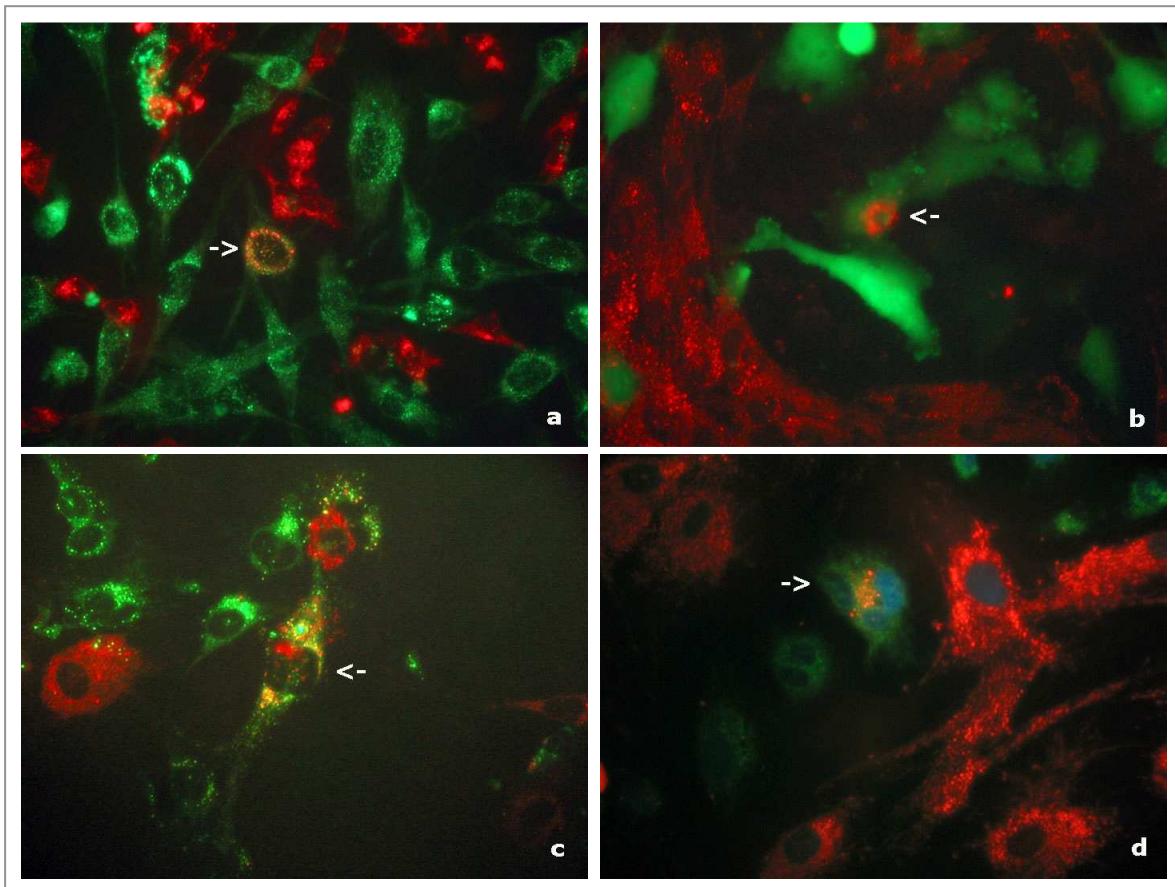
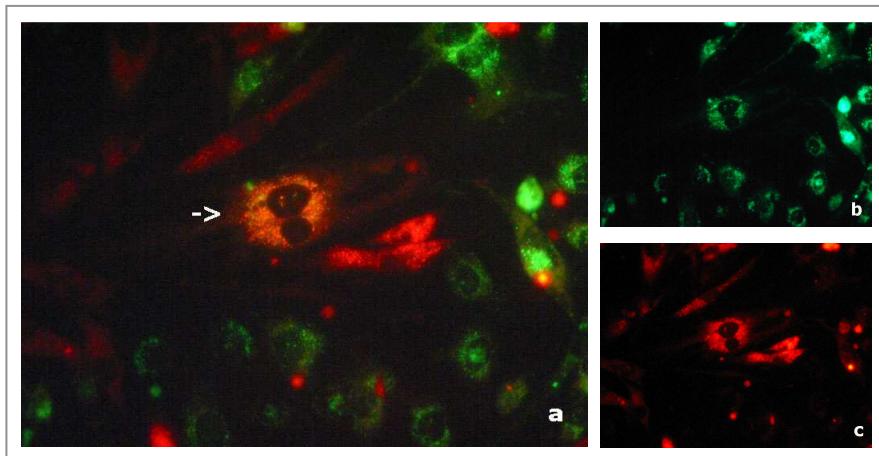


Abb.30: fusionierte Zellen: a: in einer Co-Kultur aus U373-Gliomzellen (grün) und L87-Tie2-RFP (rot) nach 24h; b: in Co-Kultur aus U373GFP und hMSC (rot) nach 24h, c: in Co-Kultur aus Astrozyten (grün) und hMSCs (rot) nach 24h, d: in Co-Kultur aus U373 (grün) und hMSCs (rot) nach 24h und Fixierung mittels PFA 4% und DAPI-Kernfärbung: auch hier lassen sich mehrere Kerne erkennen

7.3.2 Fusions-Nachweis mittels Dextran-Rhodamine

Ein alternativer Versuchsansatz stellte der Einsatz von Dextran-Rhodaminen dar. Hierbei wurden zytoplasmaständige Moleküle in die Zellen eingeschleusst, die aufgrund ihrer molekularen Größe nicht mehr über gap junction

Kanäle ausgetauscht werden können (Molekulargewicht der Dextran-Rhodamine: 10 000 MW, im Vergleich: nur Moleküle mit einer maximalen Größe von 1000MW können gap junctions passieren). Allerdings war dieser aus folgenden Gründen nicht ausreichend zielführend: Auf Grund seiner Größe musste das Molekül in die Zellen mittels mechanischer Traktion eingebracht werden und dies erforderte Zellen mit einer ausreichenden Menge an Zytoplasma. Je kleiner die Zelle, desto geringer war die Möglichkeit, den Farbstoff in die Zellen zu bringen. Tabelle 5 zeigt die getesteten Versuchskombinationen auf.

		Zellen mit Dextran-Rhodamine markiert					
		hMSC	L87-Tie2-RFP	U87	U251	U373	GB-EC
Zellen mit DiO markiert	hMSC			X	X	X	X
	L87-Tie2-RFP						
	U87	X	X				
	U251	X	X				
	U373	X	X				
	GB-EC	X	X				

Tab.5: Mit Dextran-Rhodamine durchgeführte Versuchskombinationen

oder der Gliomzelltyp U87, konnten äußerst selten beladen werden. Bei größeren Zellen gelang es auch nicht, alle Zellen mit dem Farbstoff zu inkubieren, so dass es nicht möglich war, über die Häufigkeit von Fusionen eine Aussage zu machen. Abbildung 31 zeigt einen einzelnen positiven Fusionsnachweis. Das insgesamt schwache Fluoreszenzbild dieses Farbstoffes trug zusätzlich zum schlechten Ergebnis bei, da zweifarbig Zellen erst mittels langen Kamerabelichtungszeiten identifiziert werden konnten.

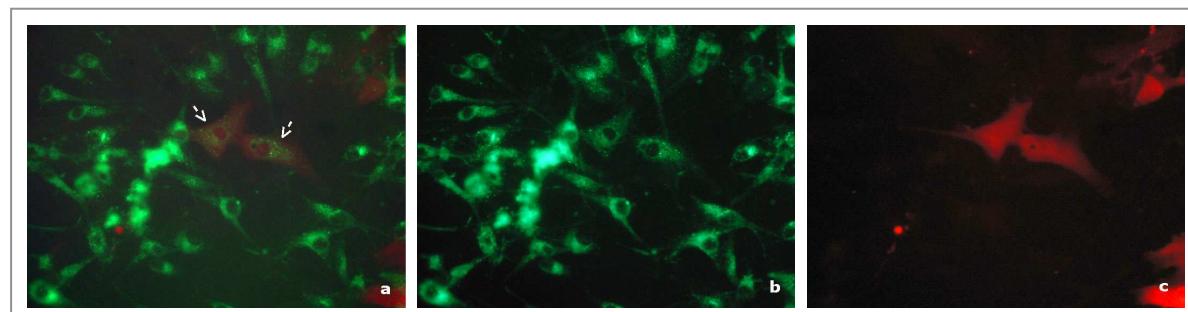


Abb. 31: a: U87-Gliomzellen DiO grün, hMSC mit Dextran-Rhodamine rot gefärbt, Pfeil zeigt auf fusionierte Zellen, Aufnahme nach 24h; b,c: Monolichtfilter derselben Aufnahme

7.3.3 Fusions-Nachweis mittels Quantum Dots

Die Versuche mit Quantum Dots stellten eine weitere Alternative zu den oben genannten Zelfarfärbstoffen Lipophilic Tracer und Dextran Rhodamine dar. Tabelle 6 zeigt die durchgeführten Versuchskombinationen auf. Fusionen konnten in allen Experimenten bereits nach einem Zeitraum von 24 Stunden nachgewiesen werden.

	U87	U251	U373	GB-EC	HUVEC	Astrozyten
hMSC	X	X	X	X	X	X
L87-Tie2-TK	X	X	X	X	X	

Tab.6: mit Quantum Dots durchgeföhrte Versuchskombinationen

Wie in Abbildung 32 zu sehen, konnte die Anzahl beobachteter Verschmelzungen nach 48 Stunden höchstens bestätigt, aber nicht bedeutend gesteigert werden. Dies lag an einer inhomogenen Verteilung der Quantum Dots innerhalb der Zelle. Das heißt, auch sie markierten in der Fluoreszenzbildgebung nicht alle Zellkompartimente oder –ränder. Eine Kombination aus Fluoreszenz- sowie Phasenkontrastmikroskopie veranschaulichte die Verteilung der Kristalle (Abb. 33, 34).

Der Fusionsnachweis anhand von polynukleolären Zellen gelang mittels DAPI-Kernfärbung, eine Quantifizierung war aber nicht möglich, da es auch hier zu einer unvollständigen Anfärbung der Zellen bzw. der Zellkerne kam (siehe Abb. 35).

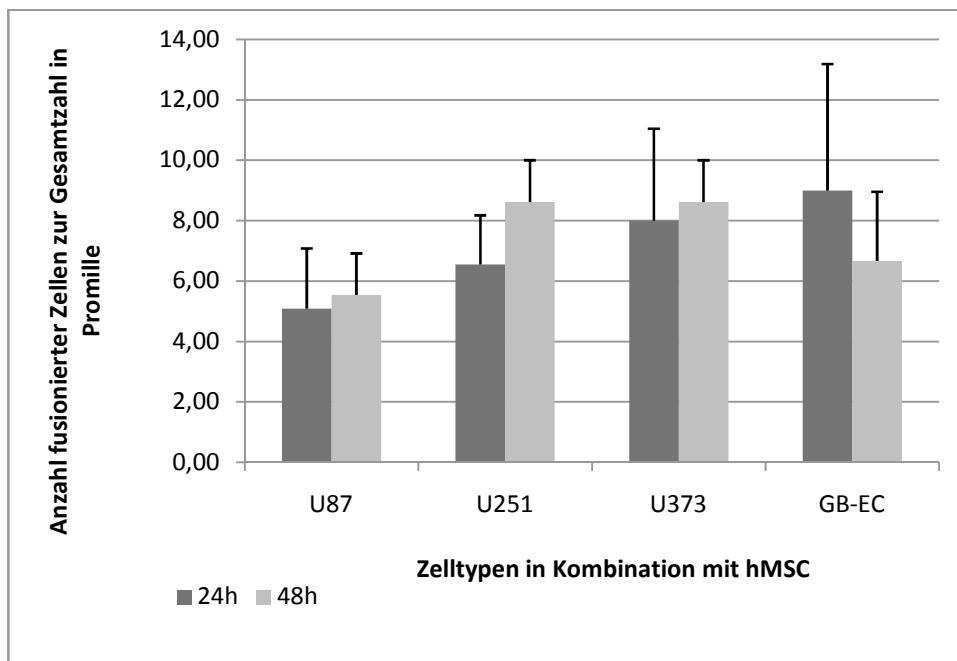


Abb.32:
Anzahl detektierter fusionierter Zellen aus hMSCs und Gliomzellen im zeitlichen Verlauf nach 24 und 48 Stunden.
Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

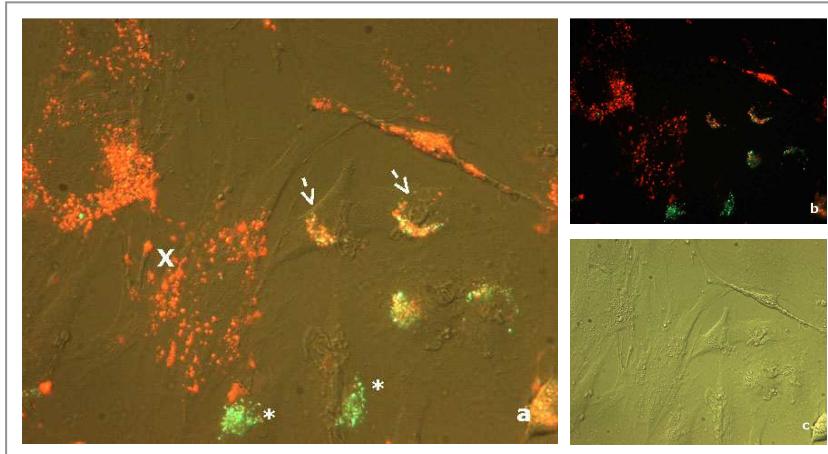


Abb.33: a: hMSC rot (x), U373-Gliomzellen grün (*), Pfeile markieren fusionierte Zellen nach 24h; außerdem zu sehen: Zentrierung der Nanokristalle auf bestimmte Zellbereiche, während große Teile unmarkiert sind.
b,c:reine Fluoreszenz- bzw. Phasenkontrastmik-

Abb.34: a: fusionierte Zellen aus hMSC (rot) und U373-Gliomzellen (grün) nach 24h
b,c: Monolichtfilter derselben Aufnahme

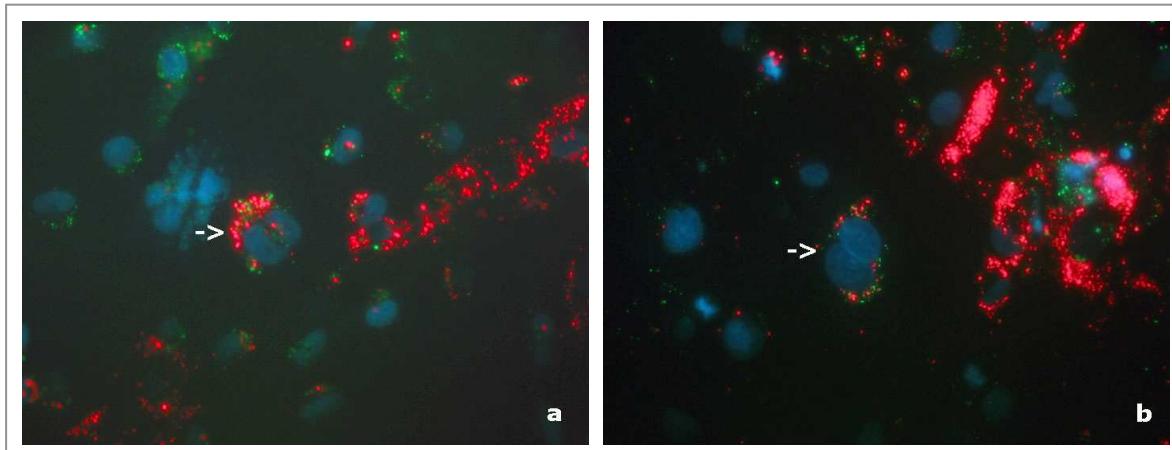
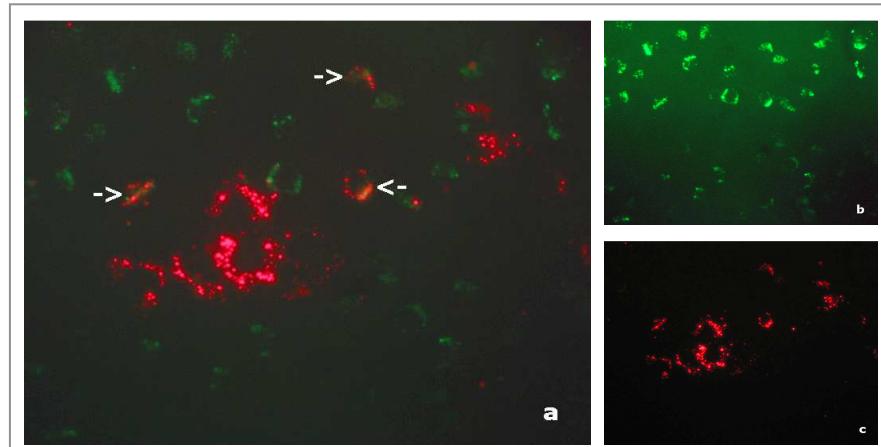


Abb.35: a: fusionierte Zelle mit zwei Kernen aus hMSC (rot) und U87-Gliomzellen (grün) nach 24h sowie DAPI-Kernfärbung.
b: fusionierte Zelle mit zwei Kernen aus hMSC (rot) und Astrozyten (grün) nach 24h sowie DAPI-Kernfärbung

7.3.4 Fusions-Nachweis mittels Organelle Lights

Eine Transfektion mittels Organelle Lights erwies sich als ein ungeeignetes beziehungsweise vom Hersteller noch nicht genügend ausgereiftes Verfahren. Trotz mehrfach modifizierter Versuchsdurchführung gelang es nicht, Stammzellen mittels Transfektion anzufärben, bei den verwendeten Gliomzellen des Typs U87 nur zu begrenztem Maße (siehe Abb. 36). Damit konnten hier – trotz vielversprechendem Ansatz - keine Erkenntnisse im Zusammenhang mit den Fusionseigenschaften zwischen diesen beiden Zellarten gewonnen werden.

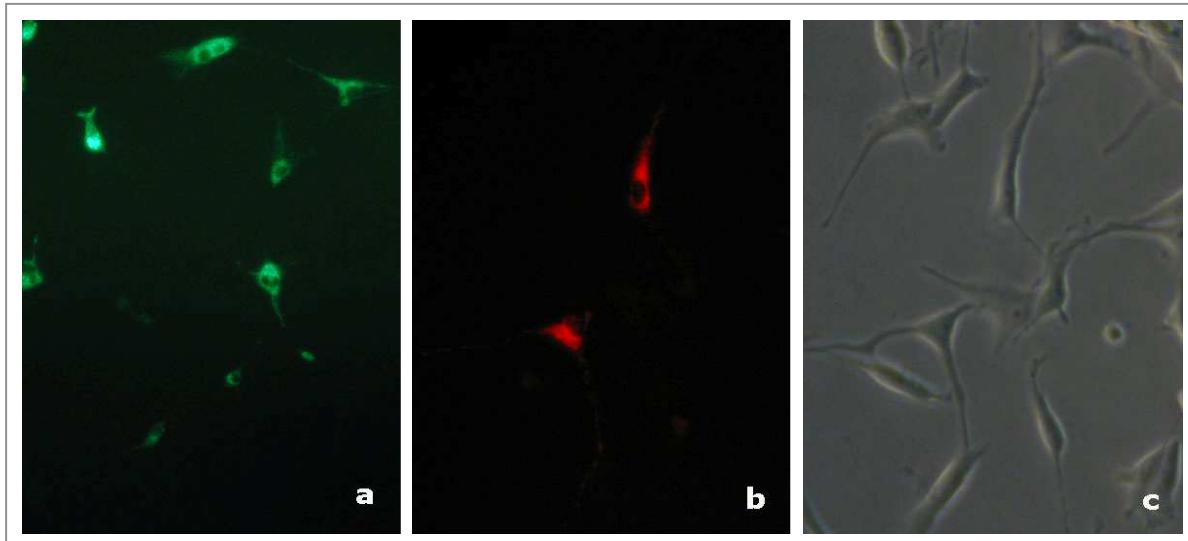


Abb.36: a: Transfektion von U87-Gliomzellen mit Organelle Lights Mitochondrien Green, b: Transfektion von U87 mit Organelle Lights Mitochondrien Red, c: zu b passendes Durchlichtbild, zu sehen ist die geringe Transfektionsrate

7.3.5 Fusions-Nachweis mittels Immunzytochemie SV40

Ein weiteres, nicht ausreichendes Verfahren stellten die Fusionsversuche mittels Immunzytochemie mit dem Antikörper SV40 und genetisch modifizierten Tumorzellen dar. Die hier erzielten Resultate konnten die mit Lipophilic Tracers oder Quantum Dots ermittelte Anzahl der Fusionen nicht bestätigen. Es wurden äußerst vereinzelt Fusionen sichtbar (siehe Abb. 37), obwohl durch die von zwei auf fünf Tage verlängerte Inkubationszeit mehr Spielraum für einen Verschmelzungsvorgang zwischen den zwei Zelltypen ließ. Gründe lagen hier in der

auch bei allen zuvor beschriebenen Versuchen beobachteten geringeren „Reaktionsfreudigkeit“ der mittels SV40 T-Antigen modifizierten Stammzellen. Dies lag zum einen an der Tatsache, dass die transfizierten Stammzellen über ein deutlich geringeres Volumen und damit über eine flächenmäßig geringere Ausbreitung mit Möglichkeit zum Zell-Zell-Kontakt verfügen, zum anderen lag nur ein hMSC-Typ in der SV40-Version vor (L87-SV40), was eine weitere Testung der Eigenschaften von transfizierten Zelltypen einschränkte. Zudem mussten, um das in den Tumorzellen vorhandene fluoreszierende Protein vor Auswaschung möglichst zu schonen, die in der Immunhistochemie durchgeführten, membranperforierenden Schritte wie unter 6.1.16 beschrieben, eingeschränkt werden.

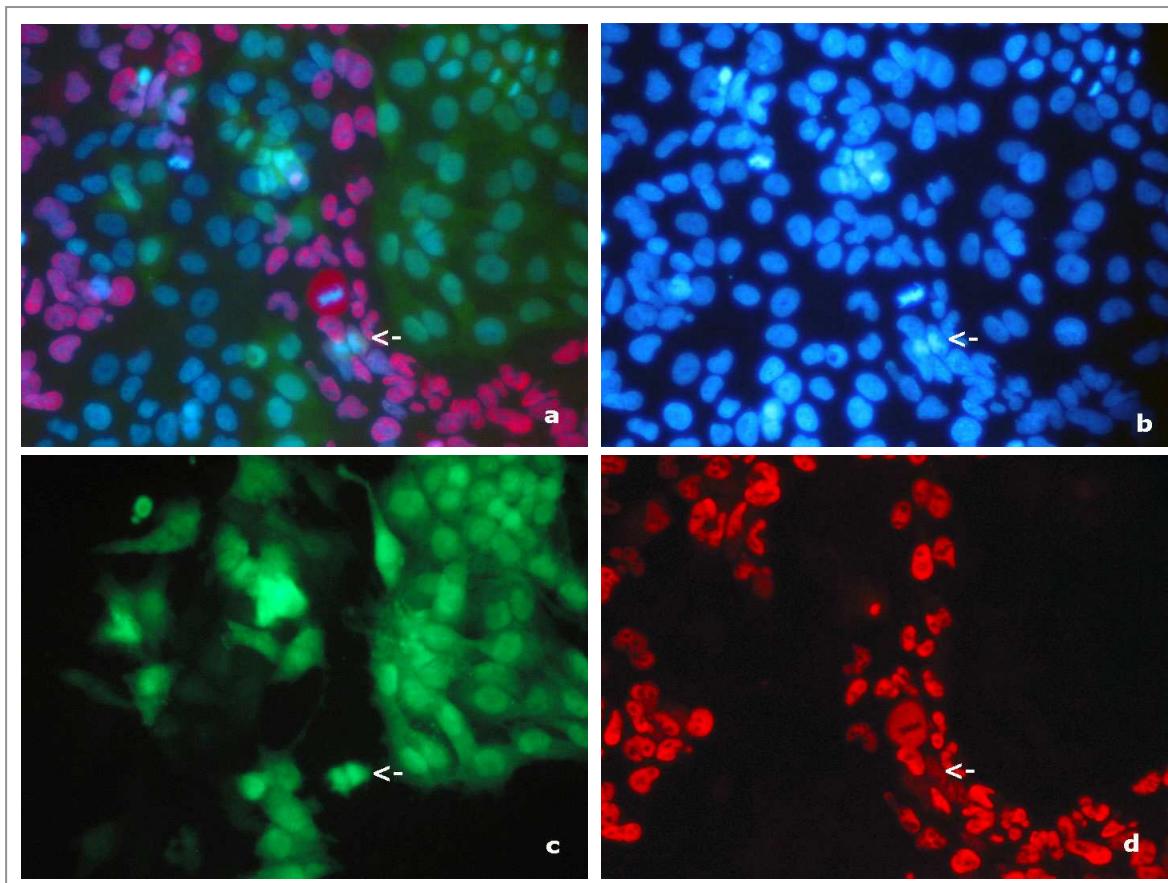


Abb.37: mit Pfeil markierte Fusion; a: Fluoreszenzaufnahme: Kerne mit DAPI blau markiert, grün-fluoreszierendes Protein der U373GFP-Gliomzellen, rot: SV40-positiv detektierte L87-Stammzellen; b: DAPI-Färbung, c: reiner Grünfilter, d: reiner Rotfilter

7.4 Tierexperimentelle Untersuchungen

7.4.1 Verlauf

Wie bereits in der Versuchsbeschreibung vermerkt, dienten diese tierexperimentellen Untersuchungen als Vorversuche für eine geplante eigenständige, aus mehreren Versuchsreihen bestehende Studie des tumorbiologischen Labors.

Nach Tumorimplantation wurde 24 Tage später das erfolgreiche Anwachsen der Glioblastomzellen mittels MRT-Scan überprüft. Zu diesem Zeitpunkt war bereits ein Versuchstier an dem rasch wachsenden Tumor ohne neurologische Prodromi gestorben. Bei den verbliebenen neun Tieren konnte in sieben weiteren ein Tumor nachgewiesen werden. Das ergibt eine Erfolgsquote der Implantation von 80%.

Zum Zeitpunkt der geplanten zweiten MRT-Kontrolle waren alle tumorpositiven Tiere bereits tot. Die mittlere Überlebenszeit betrug bei erkrankten Versuchstieren nach Implantation 32,75 Tage.

Des Weiteren konnte kein negativer Einfluss des Medikaments Ganciclovir auf die Konstitution oder das Verhalten der Tiere festgestellt werden.

Tag 0	OP: 1Mio U87 in 5µl PBS lokal
Tag 24	MRT-Kontrolle
Tag 26	2Mio L87-Tie2-Tk in 0.5ml PBS i.v.
Tag 29	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 30	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 32	2Mio L87-Tie2-Tk in 0.5ml PBS i.v.
Tag 35	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 36	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 38	2Mio L87-Tie2-Tk in 0.5ml PBS i.v.
Tag 41	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 42	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 45	2Mio L87-Tie2-Tk in 0.5ml PBS i.v.
Tag 48	MRT-Kontrolle
Tag 48	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 49	Ganciclovir-Gabe i.p. 6mg
Tag 62	Tötung der tumorfreien Tiere

7.4.2 Verlaufskontrolle mittels MRT-Scan

Die MRT-Scans dienten zum einen der Überprüfung einer erfolgreichen Implantation der Glioblastomzellen und zum anderen war beabsichtigt, den möglichen Therapieerfolg mit den L87-Tie2-Tk-Stammzellen anhand einer Verminderung des Tumorvolumens zu dokumentieren. Die erfolgreiche Implantation konnten mittels MRT-Scan nachgewiesen werden. Danach

kam es zu einer raschen Progression des Tumors und zu einem Ausfallen der weiteren Untersuchungen.

Die Aufnahmen erfolgten mit einem T2-gewichteten Verfahren in einem 1.5 Tesla-Scanner der Radiologie LMU Großhadern.

Der mittlere Tumordurchmesser in der ersten MRT-Kontrolle an Tag 24 betrug 5,3x4,2mm. Bei der zweiten Kontrolle 24 Tage später konnte bei den verbleibenden, zuvor schon tumorfreien Versuchstieren nur noch der Substanzdefekt durch die Implantation und somit das Ergebnis der ersten Kontrolle bestätigt werden.

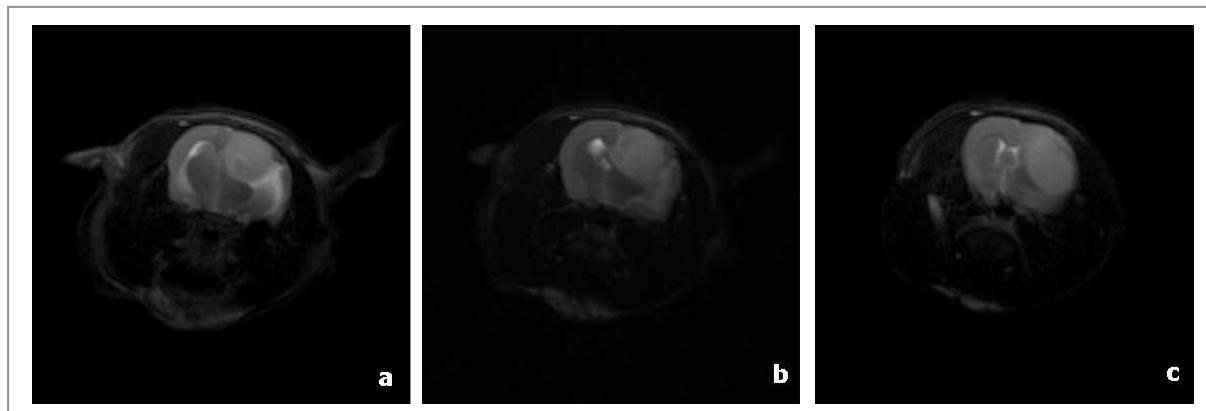


Abb.38: Abfolge T2 gewichtete MRT-Bilder eines Versuchstiers 24 Tage nach Tumorimplantation. Zu sehen ist Tumorgewebe in der rechten Hemisphäre über mehrere Schichtbilder hinweg

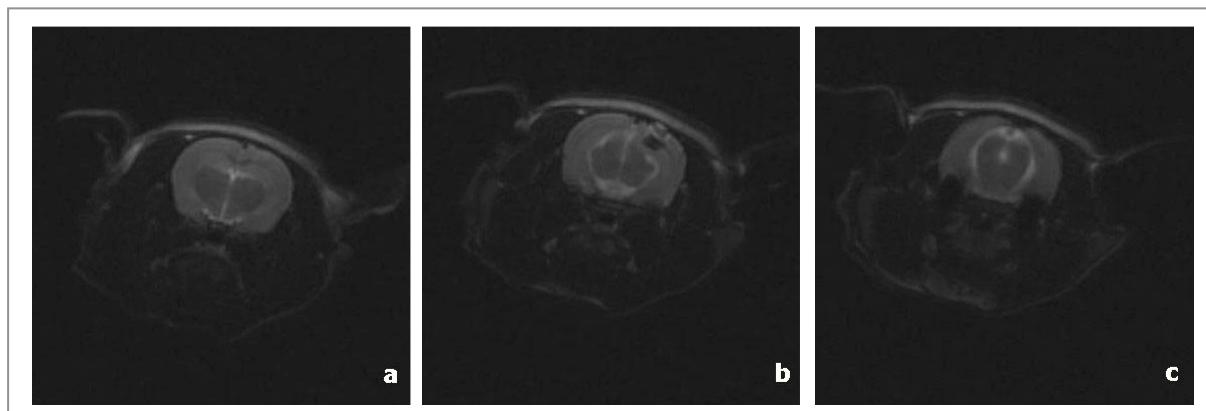


Abb.39: Abfolge T2 gewichtete MRT-Bilder eines Versuchstiers 48 Tage nach Tumorimplantation. Zu sehen ist kein Tumorgewebe, sondern in Bild b ein Substanzdefekt in der rechten Hemisphäre als Folge der Injektionsnadel

7.4.3 Immunhistochemie der Hirnpräparate

Die Anfertigung von Schnittpräparaten der Hirnresektate diente der Immunhistochemie mit SV40-Antikörpern, um das Vorhandensein von L87-Tie2-Tk-Stammzellen im Tumorgewebe zu dokumentieren und damit die Ergebnisse der L87-Tie2-RFP-Versuche zu bestätigen.

In den geborgenen Hirnen konnten mittels HE-Färbung die Resultate der MRT-Kontrollen verifiziert und Tumorgewebe detektiert werden.

Jedoch konnten weder in diesem noch in gesundem Hirnparenchym SV40-positive Zellen dokumentiert werden. Dies lässt entweder den Schluss zu, dass sich keine L87-Tie2-Tk-Stammzellen in den Präparaten befunden haben oder, dass das angedachte Verfahren funktioniert hat, die differenzierten Stammzellen durch das aktivierte Ganciclovir apoptotisch geworden sind und dennoch keinen signifikanten Auswirkungen auf das extensive Tumorwachstum hatten.

8 Diskussion

8.1 hMSCs tragen zur Neoangiogenese eines Glioms bei

Das Glioblastoma multiforme zeichnet sich durch eine hohe Vaskularisierungsrate aus⁷⁸. Die entstehenden Blutgefäße unterscheiden sich jedoch in einigen Aspekten von denen normalen oder entzündeten Gewebes: Das Tumorwachstum geht mit extensiver Gefäßproliferation, das sich in einem irregulären, unstrukturierten Versorgungsnetzwerk aus dilatierten und durchlässigen Blutgefäßen wiederspiegelt, einher^{11;96}.

Ein Grund dafür findet sich darin, dass die Neoangiogenese in Gliomen ein komplexer Vorgang ist, bei dem die benötigten endothelialen Zellen aus verschiedenen Quellen rekrutiert werden: So werden Endothelzellen aus dem Tumor naheliegenden, bereits existierenden Gefäßknospen aktiviert oder direkt endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark angelockt^{97;105}.

Des Weiteren konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass ebenso humane mesenchymale Stammzellen durch von Gliomen sezernierte Faktoren, insbesondere VEGF, geleitet, aktiv in Richtung eines Glioms migrieren^{12;106}. Es wurde bereits durch Kim SM et al postuliert, dass MSCs aus Gliomen isoliert werden können und somit *in situ* anzutreffen sind⁷¹. Außerdem konnten tierexperimentelle Versuche des tumorbiologischen Labors Großhadern zeigen, dass hMSCs nach einer systemischen Applikation zum Tumor migrieren und eine Angiogenese fördernde Rolle spielen: Hierzu wurden immortalisierte, transfizierte Stammzellen des Typs L87-Tie2-RFP verwendet. Das Reportergen RFP stand unter der Kontrolle endothelial-spezifischen Promotors des Tie2-Gens¹²¹. Die Zellen wurden von dem Gliom rekrutiert und differenzierten zu einem endothelialen Zelltyp, der die Expression des Tie2-Promotors und somit des Reportergens RFP induzierte. RFP-positive Zellen konnten im Tumorgewebe und -endothel, nicht aber im umliegenden, gesunden Hirnparenchym nachgewiesen werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass Endothelzellen abhängig vom Gewebetyp aus dem sie isoliert wurden, unterschiedliche Charakteristika aufweisen und dass aus einem Glioblastom isolierte Endothelzellen ein größeres Potenzial zur Bildung von Gefäßstrukturen haben als Zellen desselben Ursprungs aus Normalgewebe^{10;19}. Des Weiteren scheinen isolierte Endothelzellen mit zunehmender Passage *in vitro* ihre endothelspezifischen Marker zu verlieren⁸³. Aus die-

sen beiden Gründen wurden hier aus Glioblastomresektaten gewonnene Endothelzellen niedriger Passage verwendet.

Ein Effekt von hMSC auf die Neoangiogenese eines Glioms konnte hier nun auch erstmalig mit Hilfe des Tube Formation Assays, einem in vitro Modell der Angiogenese gezeigt und quantifiziert werden.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass humane mesenchymale Stammzellen alleine keine gefäßähnlichen Strukturen in vitro bilden, in Kombination mit Gliomendothelzellen hingegen schon. Darüberhinaus kommt es zu einer beschleunigten Integration der Zellen im Vergleich zu einer Monokultur aus Endothelzellen, wenn Stamm- und Gefäßzellen interagieren. Es wurde kein signifikanter Einfluss eines zuvor mit Stammzellen konditionierten Mediums auf das Wachstum von GB-ECs registriert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die gesteigerte Integration einer Co-Kultur nicht auf lösliche Botenstoffe der Stammzellen, sondern auf eine aktive Rolle der hMSCs mittels Zell-Zell-Interaktion zurück zu führen ist.

Die bereits in vivo beschriebene Differenzierung des Stammzelltyps L87-Tie2-RFP in Richtung eines endothelialen Zelltyps ließ sich in diesem in vitro Modell nicht bestätigen, was auf weitere, in diesem in vitro Versuchsansatz nicht verfügbare Faktoren wie weitere Botenstoffe schließen lässt, die für eine weitere Differenzierung hin zu einem endothelialen Zelltypus nötig sind.

Trotzdem kann auf Grund der hier, rein funktionell gewonnenen Erkenntnisse angenommen werden, dass sich die Stammzellen endothelial differenzieren können. Dies bestätigt Studien, die zeigten, dass sich hMSCs unter Einfluss des Botenstoffs VEGF, der ebenfalls von Gliomzellen sezerniert wird, in Zellen eines endothelialen Typs differenzieren und nun Kapillaren ähnliche Strukturen in einem in vitro Modell bildeten⁴⁴.

8.2 Funktionelles Synzytium aus Gliom- und Stammzellen

Die zuvor proklamierte Zell-Zell-Interaktion zwischen Gliomendothel- und Stammzellen im Zuge eines Neoangiogenese-Modells lässt offen, um welche Art der Interaktion es sich handelt und ob sie sich auf die Gefäßstrukturen beschränkt.

Als eine Möglichkeit der Interaktion kommt die Verbindung via gap junctions in Betracht. In gesundem Gewebe dienen diese Kanäle der Homöostase, also dem Austausch von Nährstof-

fen und Informationen¹⁷. Das physiologische Hirnparenchym, das zum großen Teil aus Astrozyten besteht, ist so eng zu einem funktionellen Synzytium verknüpft. Die hier gezeigten Daten aus Immunzytochemie und Western Blot Analyse bekräftigen vorhandene Ergebnisse, dass gap junctions von Astrozyten hauptsächlich aus dem Connexin 43 aufgebaut sind¹³⁷. Weitere Erkenntnisse zeigten, dass Kommunikation via gap junctions insbesondere über das im Körper weit verbreitete Cx43 auch eine Rolle in der Karzinogenese von Hirntumoren spielt: Zum einen wird postuliert, dass eine Abnahme der Connexinkonzentrationen eines Tumors im Vergleich zum Ursprungsgewebe auf den Verlust der Homöostase und eine Entwicklung mit weiterer Malignisierung hindeutet⁸¹. Dies lässt sich hier ebenfalls anhand der Western Blot Analyse nachvollziehen, die eindeutig geringere Connexinkonzentrationen in den Gliomlinien verzeichnete als in den Astrozytenextrakten. Zum anderen zeigten andere Autoren, dass die jeweilig vorhandene Anzahl an gap junctions Einfluss auf die Eigenschaften der Gliomzellen zu haben: Im Vergleich connexinreiche Tumorzellen weisen geringe Proliferationsraten auf und invasieren stärker das Hirnparenchym. Ihre Versorgung mit Nährstoffen wie ATP oder Glukose ist durch die Interaktion mit Astrozyten gesichert. Connexinarme Gliomzellen weisen eine sehr hohe Proliferationsrate auf und müssen sich durch ihre Nähe zu Gefäßen versorgen⁷⁵. Beides sind Zeichen einer hohen Malignität wie es für das Glioblastoma multiforme charakteristisch ist.

Grundsätzlich kann es durch den Austausch via gap junctions auch zu einer Veränderung der Zellen kommen. Es wurde gezeigt, dass die Kommunikation von Gliomzellen mit Astrozyten zu einer Formveränderung letzterer sowie zu einer anderen intrazellulären Protein Zusammensetzung führte, was die Autoren als Regulation der Zell-Zell-Interaktion und damit zur gesteigerten Anfälligkeit des Tumor umgebenden Gewebes während der Tumorinvasion interpretieren¹³⁷. Tube Formation Assays mit einer Kombination aus Gliomzellen und gesunden Endothelzellen konnten zeigen, dass die dort detektierte Zunahme der tubes nicht nur an dem von Gliomzellen sezernierten VEGF lag, sondern an einer Interaktion der beiden Zelltypen über Cx43 gap junctions.¹³⁸ Dies bestätigt die hier gewonnenen Ergebnisse, dass nicht Faktoren im Medium das Wachstum der Endothelstrukturen förderten, sondern die aktive Anwesenheit von Stammzellen.

Dass humane mesenchymale Stammzellen ebenfalls über Connexine und damit über die Möglichkeit einer Kommunikation via gap junctions verfügen, konnte hier ebenso wie bereits andernorts zuvor belegt werden⁴⁵. Darüberhinaus können sich hMSCs nach lokaler Injektion

über Zell-Zell-Kontakte in einen anderen Phänotyp wandeln, wie es zum Beispiel in Geweben aus Kardiomyozyten bereits berichtet wurde¹⁰². Nachdem in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen wurde, dass der Austausch zwischen Stammzellen und den getesteten Partnerzellen bidirektional verläuft, kann man postulieren, dass dieser Kommunikationsweg zu einer unstrukturierten Re-Programmierung der Stammzellen führt. Unter hypoxischen Bedingungen – wie sie in einem schnell proliferierenden Glioblastom zumeist vorherrschen - scheinen Stammzellen des Weiteren vermehrt Cx43 zu bilden, was sich in einer Steigerung dieses Effekts äußern könnte^{54;55}.

Dies hat nun für die Anwendung von hMSCs als therapeutisches Vehikel, in diesem Fall von den getesteten L87-Tie2-Tk-Zellen mit der transfizierten Thymidinkinase, Konsequenzen: Bei einem Einbau der Zellen in das Tumorgefäßsystem und einer Exprimierung dieses Enzyms wird das verabreichte Therapeutikum Ganciclovir innerhalb der Stammzellen in seine aktivierte Form umgewandelt und führt zur Apoptose der Zelle. Hier wird nicht nur die Gefäßstruktur durch das Ausfallen der eingebauten Stammzelle beeinträchtigt, sondern durch den sogenannten Bystander-Effekt werden ebenso die benachbarten Zellen mit betroffen.

Hierunter ist der Transfer des toxischen Nukleotids, dessen Molekulargewicht 255 Dalton beträgt, via gap junctions aus transfizierten Zellen in die umliegenden Zellen zu verstehen. Des Weiteren ist es möglich, dass die benachbarten Zellen durch Phagozytose apoptotische Vehikel aufnehmen, in denen sich ebenfalls das Toxin befindet^{5;33;82}. Beide Vorgänge führen zu einer Apoptose der Zellen. Eine Verstärkung kann dieser Effekt durch hohe Connexinmen gen oder durch therapeutische Vervielfältigung der Connexinstrukturen erfahren³⁸.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass sich die Kommunikation nicht nur auf eine Interaktion zwischen hMSCs und den Gliom- bzw. den Gliomendothelzellen beschränkt, sondern auch zwischen Stammzellen und physiologischen Hirnparenchym sowie Gefäßzellen vorhanden ist. So kann der Bystander-Effekt in Bezug auf die Interaktion Stammzellen und Gliomzellen einerseits eine therapeutisch positive Rolle spielen, indem benachbarte nicht in direktem Kontakt zur Stammzelle stehende Gliomzellen ebenso betroffen sind. Andererseits konnte bestätigt werden, dass die Kommunikation via gap junctions mit gesundem Gewebe, insbesondere bestehend aus Astrozyten, wesentlich ausgeprägter ist und hier einen negativen Effekt einer Therapie mit Stammzellen als Vehikel mit sich ziehen könnte. Das gesunde Hirnparenchym ist unter Umständen auch betroffen. In diese Richtung zielt die Konfiguration der verwendeten Stammzellen L87-Tie2-Tk, die sich erst im Gefäßsystem des Glioms selbst

durch aktiviertes Ganciclovir zerstören. Dennoch bleibt die Möglichkeit, dass das Toxin über die nachgewiesenen Verbindungen zwischen Gliomzellen und Astrozyten oder Endothelzellen sowie mittels des wahrscheinlichen „Schneeball-Effekts“ weitergegeben wird und so auch hier zu Nebenwirkungen führt.

8.3 Strukturelles Synzytium aus Gliom- und Stammzellen

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob es zwischen Gliom- und Stammzellen zu Fusionen, also Zellverschmelzungen kommt. Zellfusionen sind ein natürlicher Prozess, der zum Beispiel in der Entwicklung von Muskeln, Knochen oder der Plazenta eine Rolle spielt, also Gewebearten, die ganz wesentlich aus mesenchymalen Stammzellen bestehen²¹. Die Mechanismen, die zu diesem biologischen Ablauf führen sind noch Gegenstand aktueller Forschung²⁰. Dennoch konnte bereits bewiesen werden, dass die hier verwendeten, aus dem Knochenmark isolierten, adulten Stammzellen Fusionspotenzial und damit auch im Kontext des tissue-engineering Potenzial haben¹²⁴: Aus dem Knochenmark gewonnene Zellen fusionierten zum Beispiel mit Purkinjezellen, Kardiomyozyten oder Hepatozyten¹²⁵, durchliefen anschließend eine Art Transdifferenzierung hin zu dem jeweiligen Zelltyp mit dem sie verschmolzen waren¹²⁰ und fanden Anwendung in Therapiekonzepten. So dienten sie bei der Regeneration von ischämischen Herzgewebe^{47;74;135} oder von Lebergewebe¹²⁶.

Generell wird zwischen einer partiellen und einer kompletten Fusion unterschieden. Bei partiellem Charakter werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, wie es zu einem Austausch von Zellbestandteilen kommen kann: Zum Einen verbinden sich Zellen via Poren, die sich weiten können und einen Durchmesser von 100nm bis zu 6µm haben³⁵ oder es kommt zu einer Verschmelzung von Teilen der Zellmembran. Man spricht von einer Hemifusion²³. Zum Anderen wird eine Kommunikation via Nanoröhren postuliert^{29;49;103}. All diese Verbindungen haben zu eigen, dass sie groß genug sind, Membranbestandteile, Proteine oder andere Zytoplasmabestandteile auszutauschen. Es kommt jedoch nicht zu einem Transfer des Nukleus aus einer Zelle in die Andere, der bei einer kompletten Fusion zweier Zellen zu sehen wäre. Das Resultat einer derartigen Verschmelzung wäre eine polynukleäre Zelle.

Die nun hier gezeigten Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu: Die Farbstoffe Lipophilic Tracer, Quantum Dots, Dextran Rhodamin und das grün fluoreszierende Protein (GFP) in

transfizierten Zellen werden auf Grund ihrer Größe nicht über gap junctions ausgetauscht. Es kommt zwischen human mesenchymalen Stammzellen und Gliom-, Gliomendothelzellen sowie den Kontrollzellen aus Normalgewebe zum Austausch von Zellbestandteilen über 1000Da. Die Anzahl dieser Fusionen liegt nach 48h im kleinen zweistelligen Promillebereich der beobachteten Zellen. Kernfärbungen mit DAPI sowie die Co-Kultur aus U373GFP-Tumorzellen und L87-Stammzellen und die anschließende Immunzytochemie konnten zeigen, dass es sich zu einem nicht näher bestimmmbaren aber geringen Teil um komplettte Fusionen handelt. Dennoch scheint die Zahl zweifarbig detekтирter Zellen höher und damit nur durch partielle Fusionen oder durch die mögliche Aufnahme von apoptotischen Zellbestandteilen durch noch vitale Zellen erklärbar zu sein.

Mit Hinblick auf die Nutzung von genetisch modifizierten Stammzellen als therapeutische Vehikel ist die Frage nach kompletten Fusionen nicht zwangsläufig entscheidend. Ein Austausch von Zytoplasmabestandteilen und damit auch von aktiviertem Ganciclovir ist auch im Falle einer partiellen Verschmelzung gegeben. So kann in beiden Szenarien die Apoptose der Gliomzellen induziert werden. Die Nutzung der Modifizierung, also der aktivierte Thymidinkinase gelingt auch bei fusionierten Zellen aus Stamm- und Gliom- bzw Gliomendothelzellen erst nach einer Differenzierung in einen endothelialen Typ. Allein die komplette Verschmelzung mit einer Gefäßzelle des Tumors bietet die Möglichkeit einer sofortigen Aktivierung der Gensequenz der Stammzelle.

8.4 hMSCs tragen zur Tumorigenität bei

Die bisherigen Ergebnisse werfen die Frage auf, inwieweit die zuvor erläuterten Interaktionen Einfluss auf die beteiligten Zellen haben. So zeigen die Resultate des Angiogenese-Modells, dass die Stammzellen eine fördernde Wirkung auf das Wachstum des Gefäßsystems und des Glioms haben und somit unter Umständen ohne eine therapeutische Anwendung zur Progression des Tumors beitragen würden.

Auch die zur Diskussion stehenden Fusionen mögen einen weiteren malignisierenden Effekt haben. Andere Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass unregelmäßige, also nicht im Zuge von physiologischen Prozessen ablaufende Zellfusionen das Voranschreiten von Krankheiten, insbesondere von malignen Tumoren, unterstützen können³⁶. Verschmelzungen von

normalen somatischen Zellen mit Tumorzellen wie zum Beispiel aus Lymphomen, Melanomen oder Nierenzell-Carcinomen führten bei den entstehenden Hybridzellen zu einer Erhöhung der Proliferationsrate, der Resistenz gegenüber Medikamenten und Apoptosebefehlen und zu einem gesteigerten Metastasierungspotenzial^{9;28;91;92}.

In Bezug auf humane mesenchymale Stammzellen steht zur Debatte, dass sie durch ihr Vermögen zur Fusion mit und Transdifferenzierung in Zelltypen ihres umgebenden Gewebes nicht nur ein Gewinn für die Therapiemöglichkeiten sein können. Wird dieser Effekt im positiven Sinne bei Regenerationsprozessen von Herzmuskelzellen oder Hepatozyten genutzt, sollte auch bedacht werden, dass sie gleichermaßen malignes Potenzial zeigen könnten³⁴. Darüberhinaus wird ein stärkender Effekt auf Tumorzelleigenschaften im Zuge einer Fusion mit mesenchymalen Stammzellen diskutiert¹³³.

Hier schließen sich die in dieser Arbeit ermittelten Daten aus dem Sphäroidmodell an. Eine Erkenntnis ist die im Vergleich zur Co-Kultur höhere Rate an fusionierten Zellen in einem Sphäroid aus Gliom- und Stammzellen. Dies wird bedeutsam durch die Tatsache, dass dieses in vitro Modell näher an den tatsächlichen, in vivo vorherrschenden Bedingungen ist als die Co-Kultur. Eine weitere Aussage dieser Versuche ist die deutlich weitere Migrationsstrecke der Zellen aus einem gemischten Sphäroid im Vergleich zu reinen Stammzell- oder Gliomzellgloben. Dies bestätigt bereits erwähnte Ergebnisse, die eine Promotion der malignen Eigenschaften von Zellen nach Fusion darlegen. Die homogene Verteilung der vermeintlich originären Zellen sowie der Hybridzellen im Migrationsfeld eines gemischten Sphäroids macht deutlich, dass die im Vergleich gering migrierenden Stammzellen auch ohne augenscheinliche Fusion durch die Gliomzellen in ihren Eigenschaften beeinflusst werden. Eine Möglichkeit hierfür findet sich in der zuvor diskutierten Interaktion via gap junctions.

Aus diesen Gründen kann man spekulieren, dass der rasche Exitus der für diese Arbeit eingesetzten Versuchstiere nach der Gabe von Stammzellen nicht mehr nur auf dem Gliomzellen basierenden Tumorwachstums allein beruhen kann, sondern dieses auch unter dem proliferationsfördernden Einfluss der Stammzellen steht.

All diese Erkenntnisse weisen in die Richtung, dass das Vorkommen von mesenchymalen Stammzellen in einem Gliom zu dessen Tumorigenität und Proliferation beitragen könnte.

8.5 Einsatz von genetisch modifizierten hMSCs sinnvoll

Nichts desto trotz scheint der Einsatz von humanen mesenchymalen Stammzellen als ein therapeutisches Vehikel sinnvoll. Wie bereits erläutert, birgt der Einsatz von adulten, mesenchymalen Stammzellen die Vorteile einer verhältnismäßig einfachen Beschaffungsweise und einer in vitro Kultivierung in ausreichender Zellzahl. Hinzukommend konnte in vitro eine Migration von hMSCs geleitet von Botenstoffen wie VEGF in Richtung von Gliomzellen gezeigt werden^{12;106}. Auch tierexperimentelle Untersuchungen konnten belegen, dass Stammzellen, aus Knochenmark isoliert und farblich markiert, nach Injektion in die Karotiden im Gliomgewebe lokalisiert werden konnten⁸⁸. Des Weiteren kamen hMSCs bereits als therapeutisches Vehikel in einem Tiermodell zum Einsatz: Ein zur Replikation befähigter, onkolytischer Adenovirus konnte mittels Stammzellen nach lokaler Applikation in das Tumorgewebe gebracht werden¹¹⁰. Weitere Daten des Tumorbiologischen Labors, die auf Arbeiten der klinischen Biochemie der medizinischen Poliklinik der LMU beruhen, zeigen, dass sich die genetisch transfizierten, mesenchymalen Stammzellen des Typs L87-Tie2-RFP in vivo sowohl nach lokaler als auch systemischer Gabe im Gliomparenchym und –gefäßsystem nachweisen lassen und sich endothelial differenziert hatten^{24;25;87}. Dies konnte in dieser Arbeit mit der Verwendung der L87-Tie2-Tk-Stammzellen nicht bestätigt werden. Es wurden keine transfizierten Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen. Weitere Versuche müssen zeigen, ob Zellen nicht vorhanden waren oder ob diese Stammzellen sich differenziert hatten, die Thymidinkinase exprimiert hatten und unter Einfluss des aktivierte Ganciclovir apoptotisch wurden. Allein die rasche Proliferation des Tumors könnte damit den therapeutischen Nutzen dieses Verfahrens zunichte machen und weitere Korrekturen der Applikation nötig machen. So stellt diese Methode mit der angedachten Aktivierung der therapeutisch wirksamen Transfizierung erst nach Einbau der Stammzellen ins Gefäßsystem des Tumors wohl den nächsten Schritt in der Entwicklung eines auf hMSCs basierenden Therapieverfahrens dar. Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen therapeutischen Zellen und Gliomzellen lässt sich folgern: Es besteht die Möglichkeit, dass erstens: Die genetische Information der Stammzellen sich nicht nur auf diese beschränkt, sondern auch durch Fusion an Tumorzellen weitergegeben werden kann und dass zweitens: Der aktivierte Wirkstoff via gap junctions oder anderen Zell-Zell-Kontakten auch in benachbarten Zellen

Apoptosemechanismen einleiten kann. Beides führt unter Umständen zu einer gesteigerten Effektivität der Therapie.

8.6 Der Schritt von *in vitro* zu *in vivo*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche waren – mit Ausnahme der tierexperimentellen Vorversuche – allesamt *in vitro* Experimente. Vereinfachte, um viele Faktoren beraubte Abbildungen eines pathophysiologischen Zustandes.

So liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf einer Deskription von bisher derart noch nicht beschriebenen Austausch- oder Fusionsprozessen (funktionelles oder strukturelles Synzytium) von Gliomzellen mit Zellen aus gesundem Hirngewebe und/oder humanen mesenchymalen Stammzellen und den daraus resultierenden veränderten Zelleigenschaften. Ziel war folglich die Darstellung dieser Prozesse mit verschiedenen, modifizierten oder neu konzipierten Versuchsprotokollen und nicht die abschließende Quantifizierung.

Wie jedes *in vitro* Modell lassen diese Versuche aufgrund ihrer Vereinfachung keine zwangsläufige Schlussfolgerung auf ein *in vivo* Modell oder das reelle Glioblastom sondern nur Rückschlüsse auf diese zu. Es lassen sich durch diesen Effekt keine beweisenden Aussagen treffen, ob die in dieser Arbeit beschriebenen Abläufe in gleicher Weise, in gleicher Geschwindigkeit und gleicher Anzahl am lebenden Objekt ablaufen.

Es werden zum Beispiel multinukleäre Zellen und Zellfusionen in Tumoren wie dem Glioblastom beschrieben^{36;64;91;92}, doch ist die Anzahl der dort vorzufindenden polynukleären Zellen wesentlich geringer als eine Hochrechnung der hier ermittelten Zahlen vermuten lassen würde.

Auch der Einfluss der verwendeten Zelfarb- und Hemmstoffe stellt eine weitere Abweichung vom physiologischen Modell dar. Weitere Faktoren wie der Bystander-Effekt wurden bereits weiter oben beschrieben.

So können die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden und Ergebnisse nicht mehr und nicht weniger als die Grundlage für weiterführende *in vivo*-Experimente oder klinische Studien sein.

9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte eine direkte Interaktion zwischen Gliomzellen und humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Dieser Austausch erfolgt zudem bidirektional. Sowohl im Sinne eines funktionellen Synzytiums mittels Kommunikation via gap junctions als auch im Sinne eines strukturellen Synzytiums mittels partieller oder kompletter Zellfusionen kommt diese Interaktion zu Stande.

Die zur Kommunikation über gap junctions benötigten Proteine, Connexine genannt, konnten ebenso nachgewiesen werden wie der Austausch von Molekülen über diese selbst, der durch einen spezifischen Hemmstoff dosisabhängig und reversibel blockiert wurde.

Mittels verschiedener, auf Fluoreszenz beruhender Zellmarkierungsmethoden konnten partielle und komplettte Fusionen zwischen den malignen Zelltypen und den genutzten Stammzellen dokumentiert werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Interaktionen Auswirkungen auf die Morphologie und physiologischen Eigenschaften der Zellarten haben. Humane mesenchymale Stammzellen fügen sich in das entstehende Endothel des Glioms ein, verstärken somit die Neoangiogenese und Migration von Gliomen – beides wesentliche Charakteristika ihrer Aggressivität - und tragen somit zum Wachstum des Tumors bei. Darüberhinaus verändert eine Kommunikation die migratorischen Eigenschaften der unterschiedlichen Zelltypen.

Diese Erkenntnisse tragen, mit Blick auf einen Einsatz von adulten mesenchymalen Stammzellen als ein therapeutisches Vehikel in der Behandlung des Glioblastoma multiforme, zum Verständnis der Abläufe auf zellulärer Ebene bei und ermöglichen somit eine Weiterentwicklung dieses Behandlungsprinzips.

10 Literaturverzeichnis

1. Aboody KS, Brown A, Rainov NG et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:12846-51.
2. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ et al. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res.* 2006;66:9054-64.
3. Alcantara LS, Chen J, Kwon CH et al. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 2009;15:45-56.
4. Alemany R, Gomez-Manzano C, Balague C et al. Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp.Cell Res.* 1999;252:1-12.
5. Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O et al. Gap junction-mediated bystander effect in primary cultures of human malignant gliomas with recombinant expression of the HSVtk gene. *Exp.Cell Res.* 2003;284:185-95.
6. Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X et al. Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res.* 2003;63:5866-73.
7. Bairati A, Gioria M. An ultrastructural study of cell junctions and the cytoskeleton in epithelial cells of the molluscan integument. *J.Morphol.* 2007;269:319-31.

8. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004;36:568-84.
9. Bhatia B, Multani AS, Patrawala L et al. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *Int.J.Cancer* 2008;122:1483-95.
10. Bian XW, Jiang XF, Chen JH et al. Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas. *Int.Immunopharmacol.* 2006;6:90-9.
11. Bian XW, Wang QL, Xiao HL et al. Tumor microvascular architecture phenotype (T-MAP) as a new concept for studies of angiogenesis and oncology. *J.Neurooncol.* 2006;80:211-3.
12. Birnbaum T, Roider J, Schankin CJ et al. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J.Neurooncol.* 2007;83:241-7.
13. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 3 ed.Urban & Fischer Bei Elsevier, 2004.
14. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 1968;97:7.
15. Brown PD, Maurer MJ, Rummans TA et al. A prospective study of quality of life in adults with newly diagnosed high-grade gliomas: the impact of the extent of resection on quality of life and survival. *Neurosurgery* 2005;57:495-504.
16. Bruzzone R, Ressot C. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur.J.Neurosci.* 1997;9:1-6.

17. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur.J.Biochem.* 1996;238:1-27.
 18. Chamberlain MC. Treatment options for glioblastoma. *Neurosurg.Focus.* 2006;20:E2.
 19. Charalambous C, Hofman FM, Chen TC. Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme-derived and normal human brain endothelial cells. *J.Neurosurg.* 2005;102:699-705.
 20. Chen EH, Grote E, Mohler W et al. Cell-cell fusion. *FEBS Lett.* 2007;581:2181-93.
 21. Chen EH, Olson EN. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 2005;308:369-73.
 22. Clarke A, Eberhardt C. Microscopy Techniques for Materials Science. 157. 31-10-2002. Woodhead Publishing Ltd.
- Ref Type: Generic
23. Cohen FS, Melikyan GB. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J.Membr.Biol.* 2004;199:1-14.
 24. Conrad C, Gupta R, Mohan H et al. Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. *Curr.Gene Ther.* 2007;7:249-60.
 25. Conrad C, Husemann Y, Niess H et al. Linking transgene expression of engineered mesenchymal stem cells and angiopoietin-1-induced differentiation to target cancer angiogenesis. *Ann.Surg.* 2011;253:566-71.

26. Culmsee C, Gasser E, Hansen S et al. Effects of Raf-1 siRNA on human cerebral micro-vascular endothelial cells: a potential therapeutic strategy for inhibition of tumor angiogenesis. *Brain Res.* 2006;1125:147-54.
27. Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1986;134:29-36.
28. De BP, Roos E, Brys L et al. Nonmetastatic tumor cells acquire metastatic properties following somatic hybridization with normal cells. *Cancer Metastasis Rev.* 1984;3:5-24.
29. Demontis F. Nanotubes make big science. *PLoS.Biol.* 2004;2:E215.
30. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J.Neurooncol.* 2004;70:217-28.
31. Dermietzel R. Diversification of gap junction proteins (connexins) in the central nervous system and the concept of functional compartments. *Cell Biol.Int.* 1998;22:719-30.
32. Dermietzel R. Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Res.Brain Res.Rev.* 1998;26:176-83.
33. Dilber MS, Abedi MR, Christensson B et al. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res.* 1997;57:1523-8.
34. Dittmar T, Seidel J, Zaenker KS et al. Carcinogenesis driven by bone marrow-derived stem cells. *Contrib.Microbiol.* 2006;13:156-69.

35. Driesen RB, Dispersyn GD, Verheyen FK et al. Partial cell fusion: a newly recognized type of communication between dedifferentiating cardiomyocytes and fibroblasts. *Cardiovasc.Res.* 2005;68:37-46.
36. Duelli D, Lazebnik Y. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* 2003;3:445-8.
37. Essig M. MR imaging of CNS tumors: are all contrast agents created the same? *Neuro-radiology* 2006;48 Suppl 1:3-8.
38. Estin D, Li M, Spray D et al. Connexins are expressed in primary brain tumors and enhance the bystander effect in gene therapy. *Neurosurgery* 1999;44:361-8.
39. Feicht W, Buchner A, Riesenber R. [Development of an incubation system for an inverted microscopy for long-term observation of cell cultures using chamber slides]. *Biomed.Tech.(Berl)* 2001;46:133-6.
40. Festing MF, Lovell D, Sparrow S. The athymic nude rat. *Folia Biol.(Praha)* 1979;24:402.
41. Festing MF, May D, Connors TA et al. An athymic nude mutation in the rat. *Nature* 1978;274:365-6.
42. Floeth FW, Stummer W. The value of metabolic imaging in diagnosis and resection of cerebral gliomas. *Nat.Clin.Pract.Neurol.* 2005;1:62-3.
43. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1966;16:381-90.

44. Gang EJ, Jeong JA, Han S et al. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2006;8:215-27.
45. Gao Q, Katakowski M, Chen X et al. Human marrow stromal cells enhance connexin43 gap junction intercellular communication in cultured astrocytes. *Cell Transplant*. 2005;14:109-17.
46. Gao X, Yang L, Petros JA et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr.Opin.Biotechnol*. 2005;16:63-72.
47. Garbade J, Schubert A, Rastan AJ et al. Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur.J.Cardiothorac.Surg*. 2005;28:685-91.
48. Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR et al. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys*. 1992;24:55-7.
49. Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett*. 2007;581:2194-201.
50. Giese A, Westphal M. Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection. *J.Cancer Res.Clin.Oncol*. 2001;127:217-25.
51. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH et al. Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *J.Neurosci.Res*. 1999;55:486-95.

52. Goldbrunner RH, Haugland HK, Klein CE et al. ECM dependent and integrin mediated tumor cell migration of human glioma and melanoma cell lines under serum-free conditions. *Anticancer Res.* 1996;16:3679-87.
53. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu.Rev.Biochem.* 1996;65:475-502.
54. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;358:948-53.
55. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J.Cell Physiol* 2006;207:331-9.
56. Greenberg M, Arredondo N, Duckworth E. *Handbook of Neurosurgery*. 6 ed. Thieme Medical Publishers, 2008.
57. Hansis C. Totipotency, cell differentiation and reprogramming in humans. *Reprod.Biomed.Online.* 2006;13:551-7.
58. Hegi ME, Diserens AC, Godard S et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:1871-4.
59. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolamide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.

60. Herrlinger U, Woiciechowski C, Sena-Esteves M et al. Neural precursor cells for delivery of replication-conditional HSV-1 vectors to intracerebral gliomas. *Mol.Ther.* 2000;1:347-57.
61. Hess KR. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J.Neurooncol.* 1999;42:227-31.
62. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J.Clin.Pathol.* 2004;57:965-9.
63. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.
64. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2006;65:846-54.
65. Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J.Cell Biol.* 1986;103:171-87.
66. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.* 2003;540:7-14.
67. Jain RK, di TE, Duda DG et al. Angiogenesis in brain tumours. *Nat.Rev.Neurosci.* 2007;8:610-22.
68. Johnson LD. The biochemical properties of basement membrane components in health and disease. *Clin.Biochem.* 1980;13:204-8.

69. Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* 2004;15:406-10.
70. Kim SH, Banga S, Jha KK et al. SV40-mediated transformation and immortalization of human cells. *Dev.Biol.Stand.* 1998;94:297-302.
71. Kim SM, Kang SG, Park NR et al. Presence of glioma stroma mesenchymal stem cells in a murine orthotopic glioma model. *Childs Nerv.Syst.* 2011;27:911-22.
72. Klausen B, Hougen HP. Quantitative studies of lymphoid organs, blood and lymph in inbred athymic and euthymic LEW rats under germfree and specified-pathogen-free conditions. *Lab Anim* 1987;21:342-7.
73. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* 2005;23:567-75.
74. Lee N, Thorne T, Losordo DW et al. Repair of ischemic heart disease with novel bone marrow-derived multipotent stem cells. *Cell Cycle* 2005;4:861-4.
75. Lin JH, Takano T, Cotrina ML et al. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J.Neurosci.* 2002;22:4302-11.
76. Linn J, Schwarz F, Schichor C et al. Cranial MRI of small rodents using a clinical MR scanner. *Methods* 2007;43:2-11.
77. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. *WHO Classification of Tumours, Volume 1.* 4 ed. World Health Organization, 2007.

78. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.(Berl)* 2007;114:97-109.
79. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-28.
80. McNeil PL, Murphy RF, Lanni F et al. A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J.Cell Biol.* 1984;98:1556-64.
81. Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim.Biophys.Acta* 2005;1719:125-45.
82. Mesnil M, Yamasaki H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 2000;60:3989-99.
83. Miebach S, Grau S, Hummel V et al. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades. *J.Neurooncol.* 2006;76:39-48.
84. Miller CR, Perry A. Glioblastoma. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2007;131:397-406.
85. Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:2563-9.
86. Mollard R, Denham M, Trounson A. Technical advances and pitfalls on the way to human cloning. *Differentiation* 2002;70:1-9.

87. MotaIn H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 2010;116:2519-30.
88. Nakamizo A, Marini F, Amano T et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005;65:3307-18.
89. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
90. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:10344-9.
91. Pawelek JM. Tumour cell hybridization and metastasis revisited. *Melanoma Res.* 2000;10:507-14.
92. Pawelek JM. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6:988-93.
93. Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A stereotaxic atlas of the rat brain.* 2 ed. 1979.
94. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
95. Plate KH. Gene therapy of malignant glioma via inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1996;15:237-40.
96. Plate KH, Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp.Toxicol.Pathol.* 1995;47:89-94.

97. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 1995;15:339-47.
98. Plattner H, Hentschel J. Zellbiologie. 3. 8-2-2006. Thieme, Stuttgart.
- Ref Type: Generic
99. Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ et al. Adult stem cell plasticity. *J.Pathol.* 2002;197:441-56.
100. Rainov NG, Ren H. Gene therapy for human malignant brain tumors. *Cancer J.* 2003;9:180-8.
101. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat.Med.* 1997;3:1354-61.
102. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS et al. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 2003;126:124-32.
103. Rustom A, Saffrich R, Markovic I et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303:1007-10.
104. Sabatier J, Uro-Coste E, Benouaich A et al. Immunodetection of SV40 large T antigen in human central nervous system tumours. *J.Clin.Pathol.* 2005;58:429-31.
105. Santarelli JG, Udani V, Yung YC et al. Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain. *Neurosurgery* 2006;59:374-82.

106. Schichor C, Birnbaum T, Etminan N et al. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp.Neurol.* 2006;199:301-10.
107. Schichor C, Kerkau S, Visted T et al. The brain slice chamber, a novel variation of the Boyden Chamber Assay, allows time-dependent quantification of glioma invasion into mammalian brain in vitro. *J.Neurooncol.* 2005;73:9-18.
108. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM et al. Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann.Neurol.* 1999;46:183-8.
109. Simpson JR, Horton J, Scott C et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 1993;26:239-44.
110. Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA et al. Mesenchymal Stem Cells Effectively Deliver an Oncolytic Adenovirus to Intracranial Glioma. *Stem Cells* 2008.
111. Stepp H, Beck T, Pongratz T et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol.* 2007;26:157-64.
112. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 1998;153:1459-66.

113. Stummer W, Beck T, Beyer W et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *J.Neurooncol.* 2007.
114. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multi-centre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7:392-401.
115. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann KS et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolamide followed by adjuvant temozolomide. *J.Clin.Oncol.* 2002;20:1375-82.
116. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.
117. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.
118. Tanious FA, Veal JM, Buczak H et al. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992;31:3103-12.
119. Taphoorn MJ, Stupp R, Coens C et al. Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2005;6:937-44.
120. Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-5.

121. Thalmeier K, Huss R. Highly efficient retroviral gene transfer into immortalized CD34(-) cells and organ distribution after transplantation into NOD/SCID mice. *Cytotherapy*. 2001;3:245-51.
122. Tonn JC, Kreth FW, Goldbrunner R et al. *Manual Hirntumoren und spinale Tumoren*. 3 ed.W. Zuckerschwerdt Verlag, 2007.
123. Ucuzian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. *World J.Surg.* 2007;31:654-63.
124. varez-Dolado M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front Biosci.* 2007;12:1-12.
125. varez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968-73.
126. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-4.
127. Vince GH, Bouterfa H, Goldbrunner R et al. Fast blue, a fluorescent tracer in glioma cell culture, affects cell proliferation and motility. *Neurosci.Lett.* 1997;233:148-50.
128. Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW, Jr. et al. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum.Immunol.* 1993;37:264-70.
129. White TW, Bruzzone R, Goodenough DA et al. Voltage gating of connexins. *Nature* 1994;371:208-9.

130. Willecke K, Eiberger J, Degen J et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol.Chem.* 2002;383:725-37.
131. Wolvetang EJ, Pera MF, Zuckerman KS. Gap junction mediated transport of shRNA between human embryonic stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;363:610-5.
132. Wrensch M, Minn Y, Chew T et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro.Oncol.* 2002;4:278-99.
133. Wu XZ, Chen D, Xie GR. Bone marrow-derived cells: roles in solid tumor. Minireview. *Neoplasma* 2007;54:1-6.
134. Yan X, Liu B, Lu SH et al. [The effects of stem cell factor on proliferation, transmigration, capillary tube formation of endothelial cells and on the chemotaxis of CD133(+) cells]. *Zhonghua Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* 2011;32:326-30.
135. Yoon YS, Lee N, Scadova H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol.Cell* 2005;97:253-63.
136. Zamecnik J, Vargova L, Homola A et al. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 2004;30:338-50.
137. Zhang W, Couldwell WT, Simard MF et al. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res.* 1999;59:1994-2003.
138. Zhang W, DeMattia JA, Song H et al. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J.Neurosurg.* 2003;98:846-53.

11 Danksagung

Ich danke

Herrn Professor Dr. med. Jörg-Christian Tonn und Herrn PD Dr. med. Roland Goldbrunner für die Bereitstellung des Themas und der Forschungsmöglichkeiten sowie für die kompetente Betreuung im Verlauf der Arbeit

Herrn Dr. med. Christian Schichor für die professionelle Betreuung und Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit geführt haben

Frau Stefanie Lange, Frau Yvonne Hader und Frau Julia Kranich für die kompetente Unterstützung im Verlauf der Arbeit

Herrn Dr. Igor Paron für die kompetente Unterstützung im Verlauf der Arbeit

Herrn Dr. Rainer Riesenbergs, Tumormarketing Labor Großhadern und Herrn Dr. Alexander Buchner, Urologie Klinikum Großhadern für die freundliche Zusammenarbeit und Bereitstellung ihrer Forschungsmöglichkeiten

Frau Dr. med. Jennifer Linn, Radiologie Klinikum Großhadern für die freundliche Zusammenarbeit

Frau Angelika Henn, Institut für Neuropathologie Großhadern für die freundliche Zusammenarbeit

Frau Dr. Irene Teichert von Lüttichau, klinische Biochemie der medizinischen Poliklinik LMU für die freundliche Zusammenarbeit

Meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums

